

London, 1961

THESIS

Lane ✓
Egbert

DE INVLOED VAN AMINOZUREN
OP HET ONTSTAAN VAN
L-VORMEN VAN GROEP A
STREPTOCOCCEN

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

M. F. MICHEL



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DE INVLOED VAN AMINOZUREN
OP HET ONTSTAAN VAN
L-VORMEN VAN GROEP A
STREPTOCOCCEN

Dit proefschrift werd bewerkt in het Instituut voor Rheuma onderzoek van
de Stichting Leidse Rheumatologische Kliniek (Hoogleraar Directeur
Prof.Dr. J.Goslings), Academisch Ziekenhuis te Leiden, onder leiding van
Dr. W.Hijmans

DE INVLOED VAN AMINOZUREN OP HET ONTSTAAN VAN L-VORMEN VAN GROEP A STREPTOCOCCEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN
DE GENEESKUNDE AAN DE RIJSUNIVERSITEIT
TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR. G. SEVENSTER, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT
DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 25 OKTOBER 1961 TE 16 UUR

DOOR

MARC FRANCOIS MICHEL

GEBOREN TE MAASTRICHT IN 1926

Promotor: Prof.Dr. J.D.Verlinde

INHOUD

Hoofdstuk I

DE L-PHASE VAN BACTERIEN	9
Ontdekking en isolering	9
Morphologie en groei	10
Kweektechniek	11
A. De voedingsbodem	12
B. Stoffen of agentia met L-inducerende werking	14
Reincultuur van de L-phase; stabiele en labiele phase	16
Overige eigenschappen van de L-phase	17
A. Serologische eigenschappen	17
B. Pathogenese eigenschappen	17
C. Stofwisseling	18
D. Chemische samenstelling	18
Afbakening van het begrip L-phase	19
A. Pleuropneumonieachtige lichamen	19
B. Protoplasten	20

Hoofdstuk II

DE INVLOED VAN DE VERMINDERING VAN HET ZOUT- en SERUM- GEHALTE OP DE GROEI VAN DE L-PHASE; HET KWEKEN IN VLOEIBAAR MILIEU	21
Vraagstelling	21
Techniek	21
Uitkomsten	22
Discussie en samenvatting	24

Hoofdstuk III

DE POTENTIERENDE WERKING VAN GLYCINE EN ANDERE AMINO- ZUREN OP DE INDUCTIE VAN DE L-PHASE VAN GROEP A STREP- TOCOCEN DOOR PENICILLINE OF D-CYCLOSERINE	25
Inleiding en vraagstelling	25
Techniek	26
Uitkomsten	28
Discussie	40
Samenvatting	44

Hoofdstuk IV

AMINOZUREN, AMINOSUIKERS EN SUIKERS VOORKOMEND IN DE CEL- WAND VAN 26 STAMMEN GROEP A STREPTOCOCCEN	46
Vraagstelling	46
Litteratuuroverzicht over de samenstelling van de celwand van Gram- positieve bacteriën	47
A. Inleiding	47
B. Isolering van de celwand	48
C. Chemische samenstelling	50
Techniek	54
Uitkomsten	59
Discussie	63
Samenvatting	64

Hoofdstuk V

ONDERZOEK OVER DE WERKING VAN PENICILLINE EN D-AMINO- ZUREN BIJ GROEP A STREPTOCOCCEN EN STAPHYLOCOCCEN	65
Vraagstelling	65
Inleiding	65
Techniek	69
Uitkomsten	71
Discussie	78
Samenvatting	82
AANHANGSEL	84
SAMENVATTING	85
SUMMARY	91
LITTERATUUR	96

Hoofdstuk I

DE L-PHASE VAN BACTERIEN

Ontdekking en isolering

In 1935 nam Klieneberger in een cultuur van *Streptobacillus moniliformis* een van de normale bacterievorm afwijkende groei waar. Bij overenting bleek het mogelijk van deze kolonies een reincultuur te kweken, welke door haar de L1 (naar het Lister Instituut) werd genoemd. Op grond van de morphologische kenmerken van deze kolonies hield zij de L1 voor een pleuropneumonieachtig lichaam, dat in symbiose met de *S. moniliformis* groeide. Voornamelijk door het werk van DIENES (1939 a en b) kwam enkele jaren later vast te staan dat de L1 niet als een symbiont, doch als een veranderde groeiwijze van de *S. moniliformis* zelf moest worden opgevat.

Deze zienswijze is thans algemeen aanvaard, mede op grond van het feit dat korte tijd later onder welgekozen omstandigheden een afwijkende groei te voorschijn kon worden geroepen bij stammen van o.m. *Bacteroides*, *Proteus*, *Salmonella typhosa* en *Haemophilus influenzae* (DIENES, 1951), die sterke gelijkenis vertoonde met de L1. Deze bijzondere groeiwijze wordt de L-phase of L-vorm van de betreffende bacteriesoort genoemd. In tegenstelling tot andere veelvuldig bij bacteriën voorkomende afwijkende vormen is de groei in de L-phase gekenmerkt door kolonievorming en overentbaarheid.

Door wijzigingen in de kweekvoorwaarden is het in de afgelopen jaren gelukt de L-phase van een toenemend aantal bacteriesoorten te kweken. Met name worden hier genoemd, de L-phase van *Streptococcus* (DIENES, 1953a, SHARP, 1954, HIJMANS en KASTELEIN, 1960), *Staphylococcus* (DIENES, 1956, PROZOROVSKII, 1958), *Pneumococcus* (MADOFF en DIENES, 1958) en *Mycobacterium* (ALEXANDER-JACKSON, 1945, MATTMAN, TUNSTALL. MATHEWS en GORDON, 1960, SCHÖNFELD, 1961a).

Het is niet onaannemelijk, dat het binnen afzienbare tijd mogelijk zal zijn de L-phase van nog meer bacteriesoorten af te zonderen. Wellicht is de overgang

van de bacterie in de L-phase zelfs een potentiële eigenschap van bacteriën in het algemeen.

Morphologie en groei

De L-kolonies van verschillende bacteriesoorten zijn op grond van hun morphologische kenmerken moeilijk van elkaar te onderscheiden. Ze zijn in het algemeen, kleiner dan bacteriekolonies, en vaak niet voor het blote oog zichtbaar (MATTMAN en STARNES, 1959). L-kolonies blijken bij matige vergroting opgebouwd te zijn uit een donker centrum met daaromheen een lichte rand, hetgeen wordt veroorzaakt door sterke dieptegroei. Volgens RAZIN en OLIVER (1961) kan de dieptegroei van L-kolonies als volgt worden verklaard. L-elementen op het agar oppervlak gebracht, worden met water naar binnen gezogen en groeien tussen de agarvezels uit tot ronde kolonies. Na verloop van tijd breken deze door naar het oppervlak en vormen daar in de dunne waterfilm de perifere zone. Door de dieptegroei kan het materiaal niet met de entnaald van de voedingsbodem worden afgestreken. De microscopie van L-kolonies wordt dan ook veelal *in situ* verricht op een blokje agar van een doorzichtige voedingsbodem. Het contrast kan door kleuring met methyleenblauw en azuur II (DIENES, 1939) worden versterkt, doch bij fasecontrastmicroscopie is dit overbodig. De relatieve afmetingen van het centrum en de perifere zone van L-kolonies worden beïnvloed door de samenstelling van de voedingsbodem. Zijn de groeivoorwaarden ongunstig, dan breken de kolonies niet door naar het oppervlak en komt de perifere zone niet tot ontwikkeling.

Het microscopische beeld wordt gekenmerkt door veelvormige structuren. De eenvormige contouren kenmerkend voor normale bacteriegroei, ontbreken geheel. Bij sterke vergroting ($\times 2000$) blijken genoemde structuren te bestaan uit blazen van zeer verschillende afmeting ($0.3 - 5\mu$). De grootste blazen zijn optisch leeg of bevatten enkele wandstandige korrels, de kleinere kunnen geheel of gedeeltelijk ondoorzichtig zijn en maken daardoor een korrelige indruk. Door opvoeren van het oplossend vermogen door middel van electronenmicroscopie is echter gebleken dat ook de kleinste elementen van de L-phase uit korrelhoudende blaasjes bestaan (DIENES, 1953, WEIBULL, 1958, v.d. HOOFF en HIJMANS, 1959).

De bestudering van de morphologie van de volwassen L-kolonie geeft geen opheldering over de wijze waarop bacteriën in de L-phase overgaan en vervolgens tot L-kolonies uitgroeien. Gegevens hieromtrent kunnen wel verkregen worden met behulp van fasecontrastmicroscopische serie-opnamen en films. Uit de gegevens welke met deze technieken werden verkregen kan de ontwik-

keling van de L-phase als volgt worden gereconstrueerd (TULASNE, 1960). Onder zeer bepaalde omstandigheden kunnen bacteriën opzwellen tot ronde blaasjes. Deze vormen uitstulpingen, welke zich vertakken in de agar. Door knopvorming aan deze vertakkingen ontstaan kleine blazen ($\pm 0.5 \mu$), welke opnieuw uitstulpen en afsnoeren, of grote tot zeer grote blazen, welke vermoedelijk geen functie meer hebben. Er worden zodoende trossen van kleine blazen gevormd, welke geleidelijk de afmetingen van kleine overentbare L-kolonies verkrijgen. De door TULASNE (1955) beschreven theorie van een levenscyclus, waarbij nieuwe blazen zich ontwikkelen uit korrels, welke vrijkomen door het barsten van oude blazen is thans verlaten (WEIBULL, 1960, ROUX, 1960).

DIENES (1951) heeft erop gewezen, dat bij *Proteus* en *Salmonella typhimurium* twee verschijningsvormen van de L-phase kunnen voorkomen, welke hij 3A en 3B kolonies noemde. L-kolonies van het 3A type zijn kleiner dan 500μ . Ze zijn opgebouwd uit een centrum van kleine L-elementen ($0.25 - 0.5 \mu$), waaromheen zich na enkele dagen groei een krans van wat grotere blaasjes ($< 5 \mu$) schikt. De 3B kolonies zijn veel groter ($2 - 5 \text{ mm.}$) en bestaan uitsluitend uit grote blazen ($7 - 10 \mu$), welke toenemen in aantal door eenvoudige deling. Het is waarschijnlijk, dat de morphologische structuur van L-kolonies van het 3A en 3B type in de eerder beschreven „klassieke" L-kolonie gelijktijdig voorkomt.

Op grond van het morphologische beeld is reeds zeer vroeg de veronderstelling geuit, dat het wezenlijke verschil tussen groei in de L-phase en normale bacteriegroei moet worden gezocht in het geheel of gedeeltelijk ontbreken van de bacteriewand.

Kweektechniek

De L1, welke door Klieneberger afgezonderd werd uit een cultuur van *Streptobacillus moniliformis*, neemt - enkele uitzonderingen daargelaten - onder de L-vormen van bacteriën een bijzondere plaats in. Immers voor het maken of induceren van de L-phase van de meeste bacteriën moet worden voldaan aan één of meer bijzondere groeivoorwaarden, terwijl de L1, althans *in vitro*, spontaan optrad.

De bijzondere groeivoorwaarden welke vereist zijn voor het isoleren van de L-phase, zijn in het algemeen van tweeërlei aard. Zij dienen namelijk enerzijds gekweekt te worden in een rijk basismilieu, waaraan serum en meestal zouten toegevoegd moeten worden, terwijl anderzijds voor hun ontstaan stoffen

of agentia met een specifieke L-inducerende werking noodzakelijk zijn. Deze laatste hebben, wat hun werking betreft, vermoedelijk alle gemeen, dat ze op één of andere wijze de samenstelling van de celwand beïnvloeden. Deze twee groepen van factoren zullen thans in het kort worden besproken.

A. De voedingsbodem

a. Het basismilieu

Een geschikt medium voor de groei van de L-phase is een met trypsine behandeld infuus van runderhart, waaraan 1,3% agar en 10% geïnactiveerd paardeserum zijn toegevoegd. DIENES (1956) noemt daarnaast een aantal in de handel verkrijgbare voedingsbodems, welke alle gemeen hebben, dat ze de groei mogelijk maken van bacteriën, welke hoge eisen stellen aan hun voeding. Van enkele gebruikelijke adjuvantia, zoals pepton en gistextract, werd een ongunstige invloed op de groei van de L-phase beschreven (NELLES, 1956, KANDLER en KANDLER, 1955, MEDILL O'KANE, 1954). Groei van L-phase in synthetische media werd tot nu toe alleen beschreven door MEDILL O'KANE (1954) en ABRAMS (1955) voor *Proteus* en door MATTMAN (1960) voor mycobacteriën.

b. De agar

Ofschoon de rechtstreekse overgang van bacterie naar L-phase in vloeibaar milieu sporadisch beschreven is (GILMORE en BURNETT, 1959), pleegt de L-phase alleen te groeien op zachte agarhoudende voedingsbodems. Het ligt voor de hand aan te nemen dat de agar een steunende functie heeft ten aanzien van de fragiele zwelvormen waaruit de L-kolonie is opgebouwd. LEDERBERG en St. CLAIR (1958) wezen op de mogelijkheid, dat het natuurlijke netwerk van agarvezels langs mechanische weg de afsnoering van nieuwe zwelvormen bevordert. Belangwekkend zijn de proeven van ALTENBERG en LANDMAN (1960), die mutanten van de L-phase van *Proteus* verkregen op een voedingsbodem met een hoog agargehalte van 2%. Hierop ontwikkelden zich uitsluitend L-kolonies van het 3B type zonder dieptegroei, welke onmiddellijk overentbaar waren in vloeibaar milieu. De zwelvormen van deze L-kolonies waren blijkbaar zo weinig fragiel, dat ze zich ook zonder agar konden vermenigvuldigen.

c. Het serum

De toevoeging van ongeveer 10% serum aan de voedingsbodem is, behalve in de reeds genoemde gevallen van groei in synthetische media, bijna steeds noodzakelijk voor de groei van de L-phase. In plaats van serum kan ook 10% - 20% ascitesvocht worden gebruikt.

EDWARD (1953) toonde aan, dat goede groei van de L1 van *Streptobacillus moniliformis* kan worden verkregen door aan de voedingsbodem in plaats van serum, runderalbumine en een in aceton oplosbare fractie van eidooier toe te voegen. Albumine alleen gaf in dit geval slechts matige opbrengsten.

Het hoge serumgehalte van de voedingsbodem maakt het niet waarschijnlijk, dat het eiwit een voedingsfactor is. LORKIEWICZ (1957) vond, dat voor de groei van de L-phase van *Proteus carbo adsorbens* het serum in de voedingsbodem geheel kan vervangen. Hij leidde hieruit af dat het serum een detoxificerende functie heeft ten opzichte van stoffen welke voorkomen in natuurlijke media. Deze hypothese vindt steun in de proeven van MEDILL O'KANE (1954) en MATTMAN e.a. (1960), die de L-phase van respectievelijk *Proteus* en mycobacteriën verkregen in synthetische media, doch niet in natuurlijke voedingsbodems zonder toevoeging van serum. De groei van de L-phase in natuurlijke voedingsbodems zonder serum werd alleen beschreven door LEDERBERG (1958) voor *E. coli*.

d. Toepassing van hypertone media

De hierboven beschreven media maken het mogelijk de L-phase van verschillende bacteriesoorten (overzicht bij DIENES, 1951) te isoleren. Bij andere soorten gelukte dit slechts bij enkele stammen of in het geheel niet. DIENES (1953a) kon bij een groot aantal door hem onderzochte stammen α -haemolytische streptococci slechts in twee gevallen de L-phase afzonderen. SHARP (1954) kan aanvankelijk bij β -haemolytische streptococci in geen enkel geval de L-phase induceren, doch vond dat bij de meeste stammen door toevoeging van NaCl aan de voedingsbodem, in concentraties variërend van 0.25 - 1.1 N, wel L-kolonies ontstonden. Voorts stelde hij vast dat andere zouten zoals NH_4Cl , CaCl_2 en MgCl_2 in soortgelijke concentraties eveneens voor dit doel bruikbaar waren. Door het toevoegen van fosfaten aan de voedingsbodem konden HIJMANS en DIENES (1955) daarna bij 25% van de door hen onderzochte stammen van α -haemolytische streptococci de L-phase verkrijgen. DIENES (1956) toonde aan dat door toevoeging van NaCl ook de L-phase van staphylococci en diphtheroïden verkregen kon worden.

De methode door SHARP bij groep A β -haemolytische streptococci aangegeven, bleek dus ook van algemene betekenis en ze kan als een belangrijke aanwinst beschouwd worden voor het induceren van de L-phase.

De ontwikkeling van de L-phase uit bacteriën is, behalve in aanwezigheid

van electrolyten, in sommige gevallen ook door toevoeging van niet-gedisso-cieerde stoffen te bereiken. Zo verkreeg LEDERBERG (1958) goede opbrengsten van de L-phase van *Escherichia coli* door kweken in aanwezigheid van 10% - 20% sucrose, terwijl de eerste isolering van de L-phase van pneumococcen (MADOFF, 1958) en mycobacteriën (MATTMAN e.a., 1960) eveneens in sucrosehoudende media plaats vond. BONIFAS (1954) verdiepte zich in de vraag, hoe de hier besproken stoffen werkzaam zijn. Het opheffen van de functionele integriteit van de celwand onder invloed van penicilline gaat gepaard met een ophoping van kleinmoleculaire stoffen in (GALE, 1950) en buiten (HOTCHKISS, 1950) de cel. Aangezien penicilline - zoals nog besproken zal worden - een belangrijke agens is bij het maken van de L-phase, veronderstelt BONIFAS, dat het opgehoopte materiaal in de cel aanleiding geeft tot aantrekking van water uit het medium, gevolgd door zwellen en barsten van de cel. Hypertonie van het medium zou lysis kunnen voorkomen door het instellen van een osmotisch evenwicht. Dit zou kunnen geschieden, ofwel door een voor de bacteriesoort specifieke werking van ionen op de permeabiliteit van de celmembraan, ofwel door de zuiver osmotische werking van niet-gedisso-cieerde stoffen.

e. Anaërobie

Het isoleren van de L-phase van sommige bacteriesoorten wordt begunstigd door kweken onder anaërobe omstandigheden. Voor de reïncultuur is anaërobie niet vereist. Toch worden de platen ook dan bij voorkeur van de buitenlucht afgesloten, aangezien L-kolonies gevoelig zijn voor uitdrogen.

B. Stoffen of agentia met L-inducerende werking

a. In 1942 ontdekte Pierce dat, wanneer *Streptobacillus moniliformis* gekweekt werd in aanwezigheid van toenemende concentraties penicilline, het aantal L-kolonies eveneens toenam. Ook kon zij de L1 bij overenting in een penicillinehoudende voedingsbodem reïnkweken. De L1 bleek dus bovendien penicillineresistent te zijn. Deze eigenschappen van penicilline bleken later ook te gelden bij het isoleren en reïnkweken van een groot aantal andere bacteriën in de L-vorm. De grote gevoeligheid van de L-phase voor andere antibiotica (WARD, MADOFF en DIENES, 1958) heeft ten gevolge gehad dat penicilline het antibioticum bij uitstek geworden is voor het afzonderen en reïnkweken van de L-phase.

Verschillende onderzoekers hebben erop gewezen dat de hoeveelheid peni-

cilline die nodig is voor het isoleren van de L-phase, belangrijk hoger ligt dan de bacterieremmende concentratie (LEDERBERG, 1958, ALTENBERN en LANDMAN, 1960). MEDILL-BROWN en HUTCHINSON (1958) stelden vast, dat de hoeveelheid penicilline waarbij de L-phase van *Proteus* geïsoleerd kon worden, varieerde tussen 100 en 10.000 E/ml. Bij een gegeven inoculum bleek het maximum aantal L-kolonies te ontstaan bij 4000 E penicilline/ml.

b. BAUMAN en DAVIS (1957) en LEDERBERG (1959) verkregen de L-phase van een diaminopimelinezuur (DAP)-auxotrophe stam van *Escherichia coli* door deze te kweken in een normale voedingsbodem (welke geen DAP bevat). Na toevoegen van DAP aan het medium ontstond weer normale bacteriegroei. Daar het bekend is dat DAP uitsluitend in de bacteriewand voorkomt (WORK, 1957), is deze vondst ook van grote theoretische waarde voor het verkrijgen van inzicht betreffende het ontstaan van de L-phase.

c. DIENES en ZAMECNICK (1952) beschreven het ontstaan van de L-phase van *Salmonella typhimurium* en *Haemophilus influenzae* onder invloed van glycine en enkele andere aminozuren. Daar de L-inducerende eigenschappen van aminozuren in Hoofdstuk III uitvoerig besproken zullen worden naar aanleiding van eigen experimenten, wordt hier volstaan met de vermelding van deze groep van stoffen.

d. Het ontstaan van de L-phase van *Salmonella typhosa* door phaag of door immuunserum en complement werd beschreven door DIENES, WEINBERGER en MADOFF (1950). De L-kolonies ontstonden niet uit de door phaag gelyseerde cellen, doch uit kleine secundaire kolonies, welke uitgroeiden in de plaques. In het tweede geval werd de L-phase afgezonderd met behulp van konijnantiserum, caviacomplement en vers reconvalescentenserum van typhuspatienten. L-inductie door phaag is eveneens beschreven door JOIRIS (1958).

e. Een enzym met L-inducerende werking op groep A streptococcen werd beschreven door GOODER en MAXTED (1958) en FREIMER, KRAUSE en MCCARTHY (1959). Het wordt verkregen uit een bacteriophag lysaat van groep C streptococcen. Na een korte behandeling van streptococcen met dit enzym bleken deze geen celwanden meer te bezitten en ontstonden bij overenting op vaste voedingsbodem L-kolonies.

f. FALKOW (1957), voortbouwend op een waarneming van DIENES (1946), verkreeg de L-phase van *Proteus* door aan de voedingsbodem een steriel fil-

traat van een antagonistische stam toe te voegen. De werkzame fractie van het filtraat kon niet worden bepaald.

Reincultuur van de L-phase: stabiele en labiele L-phase

In het voorafgaande werden een aantal factoren opgesomd, welke het mogelijk maken de L-phase te isoleren. De uiteindelijk toegepaste methode zal afhankelijk zijn van de bacteriesoort waarmee gewerkt wordt.

Een uitvoerige beschrijving van het induceren van de L-phase van groep A β -haemolytische streptococci zal in Hoofdstuk II naar aanleiding van eigen experimenten worden gegeven. Bij de overgang van bacterie- naar L-phase bevatten de z.g. inductieplaten een mengcultuur van bacteriekolonies en L-kolonies. De laatste kunnen hieruit worden reingekeukt door herhaalde overentingen op penicillinehoudende voedingsbodems. Wordt na enkele overentingen het penicilline uit de voedingsbodem weggelaten, dan keert de bacterievorm terug. Overenting in vloeibaar milieu en toevoegen van penicillinase kunnen deze teruggang bevorderen.

Met het toenemen van het aantal overentingen blijkt echter de kans op het terugkeren (reversie) van de bacterievorm steeds kleiner te worden, totdat een punt bereikt wordt waarbij dit in het geheel niet meer mogelijk is. De reversibele L-phase wordt ook wel de labiele, de irreversibele de stabiele L-phase genoemd. De L-phase van sommige bacteriesoorten, zoals *Escherichia coli* (LEDERBERG, 1958) en *Staphylococcus* (SCHÖNFELD, 1959, 1961b) schijnt nooit stabiel te worden. Verder onderzoek zal moeten uitmaken in hoeverre deze bacteriesoorten afwijken van de regel, dat L-vormen na langdurig overenten niet langer in de bacterievorm gebracht kunnen worden. KANDLER en KANDLER (1956) bevestigden de waarneming van DIENES en WEINBERGER (1951), dat de reeds genoemde 3A en 3B kolonies van meet af aan respectievelijk stabiele en labiele L-kolonies zijn.

De bacteriën welke na reversie uit de L-phase verkregen worden, blijken volgens de meeste auteurs identiek te zijn aan de bacteriën waaruit de L-phase werd gevormd. Met name geldt, dat de penicilline gevoeligheid van een bacteriestam door alternatieve L-inductie en reversie niet wordt gewijzigd. SCHÖNFELD (1959) kon echter aantonen dat staphylococci die aanvankelijk resistent waren tegen chloramphenicol, tetracycline en erythromycine, na een aantal overentingen in de L-phase opnieuw voor deze antibiotica gevoelig werden. SCHÖNFELD (1961b) verkreeg bij staphylococci na passage in de L-vorm enkele penicillinase vormende mutanten.

Overige eigenschappen van de L-phase

In de eerste jaren na de isolering van de L1 door Klieneberger was het onderzoek voornamelijk gericht op de kweekvoorwaarden, en de morfologische en serologische eigenschappen van de L-phase. In de laatste jaren zijn ook de stofwisseling en de chemische samenstelling van de L-phase in het onderzoek betrokken. Vooral die experimenten welke ten doel hadden de aan- of afwezigheid van de celwand bij de L-phase te onderzoeken, zullen worden besproken, aangezien deze het meeste bijdragen tot de kennis van de L-phase.

A. Serologische eigenschappen

De antigene werking van bacteriën en die van hun L-phase toont sterke overeenkomst, zij het dat de antilichaamtiteren verkregen met de L-phase, vaak lager zijn dan die veroorzaakt door de bacterie. TULASNE (1949) toonde aan, dat de L-phase van *Proteus* geen H antigeen, doch wel O antigeen bevat, hetgeen, gezien het ontbreken van een flagella bij de L-phase, te verwachten was.

B. Pathogene eigenschappen

Uit onderzoekingen over verschillen in pathogene werking van bacteriën en hun L-phase blijkt, dat de pathogene eigenschappen van de uitgangsstam in het algemeen verloren gaan door de overgang in de L-phase. Zo deelden KLIENE-BERGER (1938) en FREUNDT (1956) mede, dat de L-phase van *Streptobacillus moniliformis* apathogeen is.

Dergelijke experimenten dienen, willen zij betrouwbaar zijn, verricht te worden met culturen van stabiele L-vormen, daar anders altijd de mogelijkheid bestaat van reversie *in vivo* met terugkeer van de pathogene eigenschappen van de uitgangsstam. Dit verklaart de schijnbare tegenstrijdigheid in de volgende uitkomsten. WEINBERGER, MADOFF en DIENES (1950) en SILBERSTEIN (1953) toonden aan, dat de stabiele L-phase van *Salmonella typhimurium* apathogeen is terwijl SCHNAUDER (1955) ende GREGORIO, TERRANOVA en GUERCIO (1957) vonden, dat de labiele L-phase van dezelfde bacteriesoort nog ziekteverwekkend kan zijn.

Opmerkelijk zijn ook de tegengestelde uitkomsten, welke L-culturen van exotoxinen producerende bacteriën kunnen geven. Zo deelden SCHEIBEL en ASSANDRI (1959) enerzijds mede, dat de L-phase van *Clostridium tetani* toxinen produceert, doch KAWATOMARI (1958) kon anderzijds bij de L-phase van *Clostridium perfringens* geen toxinevorming aantonen.

C. Stofwisseling

Bacteriën en hun L-phase blijken volgens enkele mededelingen niet te verschillen in hun biochemisch vermogen. FREIMER, KRAUSE en McCARTY (1959) toonden aan, dat de L-phase van haemolytische streptococci haemolysine produceert en M-proteïne uitscheidt in het medium. In tegenstelling tot de normale bacterie kan de L-phase het M-proteïne blijkbaar niet meer vastleggen in de wand. Het zuurstofverbruik en de melkzuurvorming uit glucose bedragen bij *Proteus* het 4-, respectievelijk 2,5-voudige van dat van de L-phase (MANDEL en TERRANOVA, 1956, KANDLER, ZEHENDER en MÜLLER, 1956). Hieruit volgt, dat de anaërobe glycolyse voor de L-phase mogelijk van meer betekenis is dan voor de bacterie.

Het RNA- en DNA-gehalte werd onderzocht bij *Proteus* en zijn stabiele L-phase op verschillende tijdstippen van hun groei. Bij beide werd een voorbijgaande stijging van het RNA-gehalte waargenomen in de eerste uren van de groei. Het DNA-gehalte bleef echter ongewijzigd (KANDLER, ZEHENDER en MÜLLER, 1956, WEIBULL, 1960).

D. Chemische samenstelling

SHARP, HIJMANS en DIENES (1957) toonden aan dat bij de L-phase van groep A streptococci het groepsspecifieke antigeen ontbreekt, doch het type-specifieke antigeen nog aanwezig kan zijn. Hieruit blijkt dat in de L-phase tenminste één belangrijke component van de celwand, namelijk het groepsspecifieke koolhydraat is verloren gegaan. Gebruik makend van de omstandigheid dat DAP alleen in de celwand voorkomt, bepaalden KANDLER en ZEHENDER (1957) het gehalte van deze stof bij *Proteus vulgaris* en zijn L-phase. Zij waren in staat DAP behalve bij de bacterie ook aan te tonen in de labiele L-phase, doch niet in de stabiele L-phase. WEIBULL (1958, 1960) vond daarentegen in de stabiele L-phase van *Proteus* wel geregeld een kleine hoeveelheid DAP.

PANOS, BARKULIS en HAYASHI (1959) toonden aan dat in de L-phase van groep A streptococci belangrijke celwandbestanddelen als rhamnose, mureïnezuur en glucosamine, ontbreken.

Op morphologische gronden is tot nu toe aangenomen dat de L-phase een celwandarme groeiwijze van bacteriën is. STEMPEN (1955) stelde met behulp van specifieke celwandkleuringen vast, dat de labiele L-phase van *Proteus* celwandbestanddelen bevat. De zo juist genoemde chemische gegevens komen

dus in grote trekken met de morphologische overeen. De veronderstelling, dat de L-phase weinig of geen celwand bezit, is dus juist gebleken, doch geldt alleen voor zijn stabiele vorm. Bij een vergelijkende studie van de chemische samenstelling van de normale celwand en de celwand van de labiele L-phase zullen vermoedelijk behalve kwantitatieve ook kwalitatieve veranderingen aantoonbaar zijn.

Afbakening van het begrip L-phase

De L-phase van bacteriën kan gemakkelijk verwisseld worden met twee andere verschijningsvormen in de microbiologie, namelijk pleuropneumonieachtige lichamen (PPLO) en protoplasten. Ofschoon de identiteit van de L-phase en PPLO een tijd lang voor mogelijk gehouden is, worden de laatste thans veelal als een aparte klasse van micro-organismen opgevat, waarvoor EDWARD en FREUNDT (1956) de naam *Mycoplasmataceae* hebben voorgesteld. Protoplasten daarentegen leken aanvankelijk op grond van enkele kenmerkende eigenschappen gemakkelijk van L-vormen te kunnen worden onderscheiden. Recente uitkomsten hebben echter, zoals hieronder nader uiteengezet zal worden, de verschillen tussen beide veel kleiner gemaakt en daardoor het onderscheiden bemoeilijkt.

A. Pleuropneumonieachtige lichamen (PPLO)

Pleuropneumonieachtige lichamen worden genoemd naar de verwekkers van de pleuropneumonie bij het rund en worden beschouwd als het prototype van de *Mycoplasmataceae*. PPLO-kolonies en de fragiele elementen waaruit deze zijn opgebouwd, zijn met eenvoudige middelen niet van L-kolonies te onderscheiden. Reeds lang is daarom aan de mogelijkheid gedacht dat de PPLO stabiele L-vormen zijn, waarvan de voorlopers niet kunnen worden opgespoord. WITTLER (1956) en SMITH (1957) deelden mede, dat zij corynebacteriën isoleerden uit reïnculturen van PPLO. RUYS (1960) en van ITERSSEN en RUYS (1960a en 1960b) vonden tot nog toe onbekende coccen bij 3 PPLO stammen en wezen op het mogelijke verband tussen beide levensvormen voorkomend in dezelfde cultuur. Mededelingen van deze aard zijn schaars en maken uitbreiding van het onderzoek in deze richting zeer gewenst.

KLIENE BERGER-NOBEL (1956) en EDWARD (1954) ontkennen de identiteit van PPLO en L-phase en hebben daartoe verschillen in groeivoorwaarden, ultrastructuur en afmeting van ultrafiltrabele deeltjes aangevoerd. Het verdient verder de aandacht dat PPLO behalve bij dieren ook regelmatig bij de

mens kan worden geïsoleerd (HUYSMANS-EVERS, 1955. Deze dissertatie bevat ook de overige Nederlandse literatuur over PPLO tot dat jaar), terwijl dit voor de L-phase zeer zelden is beschreven (DOLMAN en CHANG, 1951).

B. *Protoplasten*

Wanneer cellen van *Bacillus megaterium* in een vloeibaar hypertoon milieu worden blootgesteld aan de werking van lysozym, veranderen ze in osmotisch stabiele blaasjes van uniforme afmeting ($2\ \mu$) (WEIBULL, 1953). Behalve door lysozym zijn dergelijke structuren ook op andere wijzen te verkrijgen (McQUILLEN, 1960). De blaasjes zijn terecht „protoplasten" genoemd, aangezien met morfologische, chemische en immunochemische en biologische methoden het ontbreken van hun celwand is aangetoond (BRENNER e.a., 1958). De blaasstructuren van de labiele L-phase en met name van 3B L-kolonies zijn niet celwandvrij en worden ook spheroplasten genoemd (TULASNE, 1960). In de literatuur zijn protoplasten en spheroplasten herhaaldelijk verwisseld (LEDERBERG, 1958, LANDMAN, 1958).

Protoplasten keren niet terug in de bacterievorm en vermenigvuldigen zich ook niet in vast milieu. Zij waren zodoende tot voor kort gemakkelijk van de labiele L-phase te onderscheiden. Recente mededelingen van GOODER en MAXTED (1958, 1960) en FREIMER, KRAUSE en McCARTY (1959) (zie L-inductie onder e), waarbij zowel de reversie als de overgang in de L-phase van protoplasten van groep A streptococci werden beschreven, duiden erop dat het verschil tussen protoplast en L-phase, althans in sommige gevallen mogelijk geheel wegvalt.

Hoofdstuk II

INVLOED VAN DE VERMINDERING VAN HET ZOUT- EN SERUMGEHALTE OP DE GROEI VAN DE L-PHASE; HET KWEKEN IN VLOEIBAAR MILIEU

Vraagstelling

Voor het induceren van de L-phase van groep A β -haemolytische streptococci (in het vervolg afgekort tot L_{str}) is het noodzakelijk zowel zout als serumeiwitten aan de voedingsbodem toe te voegen. Nagegaan werd in hoeverre het mogelijk is een reincultuur van de L_{str} op vaste voedingsbodem in stand te houden door overenten op media waaruit het toegevoegde zout en serum geleidelijk worden weggelaten. Voorts werd gepoogd de L_{str} in vloeibaar milieu te kweken uitgaande van L_{str} reincultuur op vaste voedingsbodem.

Techniek

Stammen. Alle onderzochte stammen waren groep A β -haemolytische streptococci. Stam AED (type 12), GL 8 (type 19), ADA (type 14) waren afkomstig van Dr. L. Dienes (Boston, U.S.A.), stam P (type 39) van Dr. J. Wahl (Parijs) en stam B 6 (type 11. 27. 44) van het bacteriologisch laboratorium van de Interne Kliniek te Leiden. Alle stammen, uitgezonderd AED, GL 8 en ADA, werden getypeerd met de agglutinatiereactie.

L-inductie. Voor het overbrengen van de streptococci in hun L-phase werd in hoofdzaak de techniek toegepast welke is beschreven door SHARP (1954). Het basismilieu bestond uit 2.8% Albimi Brucella Broth (Catalogus No. A-114; Albimi Laboratories, Inc., Brooklyn 2, New York) met 1.3% agar; dit werd gedurende 15 minuten bij 121°C gesteriliseerd. Voor het gieten van de platen werd daaraan 10% steriel paardeserum (gedurende 30 minuten geïnactiveerd bij 56°C) en een geconcentreerde steriele NaCl oplossing tot een eindpercentage van 2.8% toegevoegd. Het eindvolume per plaat bedroeg 15 ml. De voedingsbodem werd beënt met enkele druppels van een 14 - 16 uren cultuur in glucose bouillon. Na gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij 37°C bebroed te zijn, werden in het centrum van de agar 3 gaatjes gemaakt, waarna met de entnaald in elk gaatje een hoeveelheid oplossing overeenkomend met 400 E penicilline werd gebracht. De platen werden vervolgens met paraffine gesloten en gedu-

rende een week bij 37° C volgens de FORTNER (1928) methode semi-anaëroob bebroed.

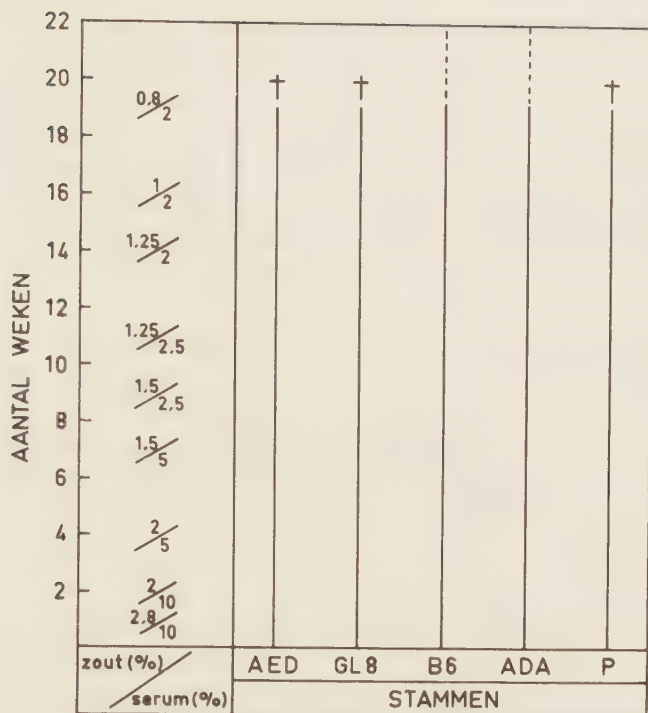
Reincultuur. In de zogenaamde inductieplaten ontstaan de L-kolonies aan de buitenzijde van de door penicilline gevormde remzone. Voor het reinkweken van deze kolonies werden een aantal blokjes agar uit dit gebied gesneden en na omkeren uitgestreken over een verse voedingsbodem waaraan 1000 E/ml. penicilline was toegevoegd. Deze platen werden eveneens gedurende een week bij 37° C semi-anaëroob bebroed.

Vloeibaar medium. De vloeibare voedingsbodem was, behoudens de agar, van dezelfde samenstelling als de vaste voedingsbodem gebruikt bij de reincultuur. Voor de overenting in vloeibaar milieu werden enkele blokjes L_{str}-houdende agar van een reincultuur in een steriele mortier fijngevreven en verdund met enkele druppels van het vloeibare medium. Het materiaal kon hierna worden opgezogen en werd geënt in 50 ml. vloeibaar medium.

Uitkomsten

Vermindering van het zoutgehalte. Een reincultuur van de L-phase van AED en GL 8 werd in twee series gedurende 6 maanden wekelijks overgeënt. Hierbij werd de hoeveelheid toegevoegd zout geleidelijk teruggebracht tot de minimum concentratie waarbij de culturen in stand gehouden konden worden. Te bedenken valt, dat de uitkomsten in feite met 0.5% dienen vermeerderd te worden, aangezien dit het zoutgehalte van de Albimi voedingsbodem is. De zoutverlaging bedroeg in de eerste serie 0.1% per week en in de tweede serie 0.25% om de twee weken. De minimumconcentraties waarbij de L_{str} AED en GL 8 in beide series in leven gehouden konden worden, bedroegen voor beide stammen respectievelijk 0.2 en 0.4%.

Vermindering van zout- en serumgehalte. De L_{str} van de stammen AED, GL 8, ADA, P en B 6 werden overgeënt van de normale voedingsbodem met 2.8% zout en 10% paardeserum (af te korten als 2.8/10) op een voedingsbodem met 2/10. Bij alle stammen werd onmiddellijk goede groei verkregen. Vervolgens werd het zout- en serumgehalte beurtelings verlaagd op de wijze aangegeven in Figuur 1. De cultuur werd telkens één of meer weken op een voedingsbodem van dezelfde samenstelling overgeënt, voordat opnieuw tot verlaging van het zout- of serumgehalte werd overgegaan. De culturen van L_{str} AED en GL 8 bleven in leven tot 1/2, terwijl de L_{str} B 6 en ADA bij 0.8/2 nog overentbaar waren.



Figuur 1. Minimum zout- en serumconcentratie waarbij nog groei van een reincultuur van de L-phase van 5 stammen groep A streptococci kon worden verkregen. De culturen werden wekelijks overgeënt. Stam B 6 en ADA waren bij 0.8% zout en 2% serum nog in leven.

Vermindering van het serumgehalte. Gevonden werd dat alleen de L_{str} AED op een voedingsbodem met een zoutgehalte van 2.8%, doch zonder serum, overentbaar was. De stam werd op deze bodem gedurende 40 weken in leven gehouden. Het minimum serumgehalte benodigd voor de groei van de L_{str} van de andere stammen, werd niet systematisch onderzocht.

Een opmerkelijke verandering in groeiwijze van de L_{str} culturen werd waargenomen, wanneer het zoutgehalte van de voedingsbodem daalde beneden 1.5% en bij de L_{str} AED op een voedingsbodem zonder serum. In beide gevallen groeiden de scherp omschreven L-kolonies niet langer in de diepte, doch er ontstond een confluerende groei aan de oppervlakte, welke met de entnaald kon worden afgestreeken en overgeënt. De veranderde groeiwijze had geen invloed op het microscopische beeld van de onderzochte L_{str} culturen.

Kweken in vloeibaar milieu. De L_{str} AED en GL 8 bleken ook zeer wel in vloeibaar milieu te groeien, mits dit geschiedde in het Albimi basis-milieu en de stammen tevoren enkele malen in de L-phase op de vaste voedingsbodem waren overgeënt. Beide stammen werden tot nu toe respectievelijk 15 en 8 maanden in leven gehouden. DIENES (1956) deelde mede dat hij met wisselend succes groei van de L_{str} in trypsine bouillon van runderhart verkreeg. De hier besproken methode was goed reproduceerbaar en is inmiddels ook beschreven door PANOS en BARKULIS (1959). GOODER en MAXTED (1961) verkregen groei van de L_{str} in trypton soya bouillon.

Het macroscopisch aspect van de L_{str} in Albimi bouillon veranderde bij het ouder worden van de cultuur. Tijdens de eerste 5 overentingen groeiden de L-elementen als speldeknoopgrote pluizige witte bolletjes. Bij de 6^e - 12^e overenting ontstonden draden, welke samenbundelden en door schudden slechts ten dele waren te scheiden. Oudere culturen gaven een homogene troebeling met een fijnkorrelig bezinksel.

Discussie en samenvatting

Terwijl de overgang van streptococcen naar L_{str} alleen plaats vindt in een voedingsbodem met een hoog zout- en serumgehalte stelt de L_{str} na adaptatie in dit opzicht minder hoge eisen. Nochtans kon de L_{str} tenslotte nooit op de normale voedingsbodem in leven gehouden worden. Het optreden van oppervlaktegroei van de L_{str} na verlaging van zout- of serumgehalte van de voedingsbodem is even weinig verklaarbaar als de dieptegroei van de L_{str} in het oorspronkelijk milieu. Aangezien echter de verlaging van het zout- en serumgehalte beide aanleiding geven tot oppervlaktegroei, zou dit een aanwijzing kunnen vormen voor een gelijksoortige werking van zout en serum. Wat de aard van deze werking betreft, wordt de mogelijkheid geopperd dat het serum eenzelfde stabiliserende invloed zou kunnen uitoefenen op de L-phase als in Hoofdstuk I werd uiteengezet voor het zout.

Het kweken van de L_{str} in vloeibaar milieu vormt een noodzakelijke voorwaarde voor een onderzoek naar de verschillen in chemische samenstelling en antigene werking van groep A streptococcen en hun L-phase. De technische uitvoering van dergelijke onderzoeken wordt echter bemoeilijkt, doordat de osmotisch fragiele L-phase slechts onder de nodige voorzorgen van het medium is te scheiden (PANOS e.a., 1959a en b).

Hoofdstuk III

DE POTENTIERENDE WERKING VAN GLYCINE EN ANDERE AMINOZUREN OP DE INDUCTIE VAN DE L-PHASE VAN GROEP A STREPTOCOCCEN DOOR PENICILLINE OF D-CYCLOSERINE

Inleiding en vraagstelling

De invloed van hoge concentraties aminozuren, met name van glycine op bacteriën is uitvoerig onderzocht door GORDON en medewerkers. GORDON en GORDON (1943) stelden vast dat cholera bacteriën in aanwezigheid van 0.25% - 1.5% glycine voor een deel overgaan in zwelvormen, terwijl bij 2% glycine de groei van de cultuur volledig was geremd. Deze zwelvormen, welke volgens de huidige terminologie vermoedelijk spheroplasten zouden worden genoemd, ontstonden eveneens onder invloed van hoge concentraties alanine, doch niet met glutaminezuur en asparaginezuur. MACULLA en COWLES (1948) zagen bij *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* en *Bacillus mesentericus* een sterke lysis optreden onder invloed van 3 M glycine. GORDON, HALL en STICKLAND (1949, 1953, 1954) vonden dat het lytisch vermogen van glycine verloren ging door bacteriën aan dit aminozuur te adapteren, door verhitting van de bacteriën tot 65° C en door groei in aanwezigheid van kwik- en zilverzouten in lage concentraties.

Zij leidden hieruit af dat de lytische werking van glycine niet kan berusten op een eenvoudige fysische werking. Lysis van *B. coli* werd behalve door glycine ook veroorzaakt door D- en L-aminozuren met een rechte keten. Het effect verminderde bij gebruik van vertakte koolstofketens, evenals door toevoeging van aminozuren met aminogroepen op de β of γ positie, terwijl acetylering, carboxylering of esterificatie van de aminogroep het lytische vermogen geheel te niet deed.

De zwellichamen van de L-phase kunnen worden opgevat als een overgangsvorm tussen bacteriegroei en lysis. DIENES en WEINBERGER (1951) en DIENES en ZAMECKNIK (1952) onderzochten daarom in hoeverre aminozuren ook de L-phase kunnen induceren. Zij vonden dat vooral glycine, doch verder ook DL-methionine, L-phenylalanine en L-tryptophaan, in concentraties variërend tussen 0.25% en 3%, L-kolonies van streptobacillen, salmonella's en haemophi-

lus bacteriën deden ontstaan. Glycine werkte bij minder bacteriesoorten L-inducerend dan penicilline.

In enkele recente publicaties worden onder de naam „protoplasten" verschijningsvormen van bacteriën beschreven welke vermoedelijk in geen enkel opzicht verschillen van de zwelvormen, waargenomen door GORDON en GORDON (1943). BRENNER e.a. (1958) stelden voor deze structuren spheroplasten te noemen. Zij ontstaan steeds uit Gram-negatieve bacteriën en er zijn sterke aanwijzingen dat zij in tegenstelling tot echte protoplasten niet vrij zijn van celwandbestanddelen. Deze „protoplasten" waren nooit overentbaar en verschillen als zodanig wezenlijk van de L-phase. De wijze waarop ze worden geïsoleerd, verdient echter de aandacht, gezien hun grote structuurverwantschap met L-vormen. WELSCH (1958) verkreeg „protoplasten" van *Escherichia coli* onder invloed van glycine, doch ook met serine en α -aminoboterzuur. LARK en LARK (1959) konden „protoplasten" van *Alcaligenes faecalis* maken met behulp van een groot aantal D-aminozuren, met uitzondering van D-glutaminezuur en D-asparaginezuur. CIAK en HAHN (1959) tenslotte beschreven het ontstaan van „protoplasten" van *Escherichia coli* onder invloed van D-cycloserine, een serinederivaat met antibiotische werking.

Het is opmerkelijk dat inductie van de L-phase door aminozuren evenals inductie van „protoplasten", alleen beschreven werd bij Gram-negatieve bacteriën. Bij de hieronder te beschrijven proeven werd nagegaan in hoeverre aminozuren ook L-inducerend kunnen werken bij Gram-positieve coccen en met name bij groep A β -haemolytische streptococcen. Onafhankelijk van het werk van LARK en LARK (1959) bleek dat bij deze bacteriesoort in aanwezigheid van penicilline dezelfde aminozuren L-inducerend werkten, als door dezen gebruikt werden voor het maken van „protoplasten".

De mededeling van CIAK en HAHN (1959) vormde de aanleiding om het L-inducerend effect van D-cycloserine te onderzoeken in voedingsbodems met en zonder aminozuren. Het L-inducerend vermogen van aminozuren werd tenslotte in verband gebracht met hun invloed op de groeidichtheid van streptococcen in vloeibaar milieu en met de aminozuursamenstelling van de celwand van deze bacteriën.

Techniek

Stammen. Naast stam AED, GL 8, ADA en B 6, genoemd in Hoofdstuk II, werden de volgende stammen groep A β -haemolytische streptococcen onderzocht: B 1 (type 1), B 4 (type 1), B 7 (type 12), B 9 (type 12), B 14 (type 3), B 17 (type 22). De B stammen hadden dezelfde herkomst als stam B 6.

L-inductie. De wijze van induceren van de L-phase verschilde in de volgende opzichten van die welke beschreven werd in Hoofdstuk II. Het basismilieus voor het eerste deel van de proeven bestond uit versetryptsinebouillon van runderhart (afgekort TB) en voor het tweede deel uit Albimi Brucella Broth (afgekort AB). Deze laatste was eenvoudiger te bereiden en gaf minder wisseling in de uitkomsten. Voor het testen van de L-inducerende werking van D-cycloserine (het synthetische product van Hoffmann-La Roche A.G.) werd in plaats van penicilline een hoeveelheid oplossing overeenkomend met 3 mg. substantie, in elk gaatje in het centrum van de agar gebracht.

Aminozuren. De racemische mengsels en de isomeren van serine, threonine, alanine, methionine, glutaminezuur, lysine en asparaginezuur en glycine werden aan de voedingsbodems toegevoegd in eindconcentraties van 0.5% - 1.5%. De zuurgraad van de voedingsbodems werd zo nodig gecorrigeerd tot pH 7. De goed oplosbare aminozuren werden afzonderlijk gesteriliseerd gedurende 15 minuten bij 121°C, de overige tezamen met de voedingsbodem. Alle aminozuren waren afkomstig van Hoffmann-La Roche A.G., behoudens glycine (B.D.H., Analar) en D-lysine monohydrochloride (een mengsel van 85% D-lysine en 15% L-lysine), dat werd bereid in het Centraal Laboratorium van de Staatsmijnen te Geleen.

Drooggewicht bepaling. Stam B 1 werd gekweekt in aanwezigheid van verschillende concentraties glycine. Telkens 15 ml. trypsine bouillon met 10% paardeserum, doch zonder zout en penicilline, werden beënt met een 2% inoculum van cellen in de exponentiële groeifase. Na 48 uur bebroeden bij 37°C werden de cellen geoogst, 2 maal gewassen, en gedroogd boven P₂O₅ tot constant gewicht. Het meten van de drooggewichten verving in dit geval de gebruikelijke troebelingsmeting methode voor de bepaling van de bacteriedichtheid, aangezien glycine inhomogene korrelige groei veroorzaakt (GORDON en GORDON, 1943).

Troebelingsmetingen. Stam AED gaf na bebroeden in aanwezigheid van verschillende concentraties van het racemische mengsel en de isomeren van methionine homogene suspensies. De invloed welke van deze stoffen uitging op de groei-dichtheid van de culturen, werd bepaald door meting van de troebelingen in een Unicam Spectrophotometer SP 500 bij een golflengte van 550 mμ. Het medium bestond uit Heart Brain Infusion (Difco) verrijkt met 10% paardeserum. Volumina van 15 ml. werden beënt als boven. De metingen werden verricht bij maximale groei, welke in dit medium na 14 uur werd bereikt.

De invloed van één concentratie, doch nu van de racemische mengsels en isomeren van alle onderzochte aminozuren, op de groeidichtheid van stam GL 8 werd op gelijksoortige wijze gemeten. De verkregen uitkomsten werden uitgedrukt als procentuele groeiremming of groeibevordering ten opzichte van de controlecultuur.

De remmingspercentages werden uit een verdunningscurve van de controlecultuur, welke een licht gebogen verloop had (fig. 3), afgelezen. Werkte een aminozuur een enkele maal groeibevorderend, dan werd de procentuele stijging ten opzichte van de controlewaarde berekend. Het onderzoek werd verricht in 1 ml. culturen Todd-Hewitt bouillon verrijkt met 10% paardeserum. De beënting geschiedde met 0.03 ml. van een 12-uurscultuur. De metingen werden verricht bij maximale groei, dat wil zeggen na 14 uur bij 37° C. De concentratie van de onderzochte aminozuren bedroeg telkens 100 mmol/l. De geringe oplosbaarheid van asparaginezuur liet een maximumconcentratie van 75 mmol/l. toe.

Gevoeligheidsbepaling. De gevoeligheid van stam AED voor D-cycloserine werd bepaald door vaststelling van de minimum concentratie welke totale groeiremming veroorzaakte. De bepaling werd verricht met een verdunningsreeks van 100 - 500 µg/ml D-cycloserine in glucosebouillon. De troebelingen werden gemeten bij 550 mµ na 24 uur bebroeden bij 37° C.

Betekenis van de gebruikte symbolen. Het aantal L-kolonies dat onder invloed van penicilline ontstond was binnen bepaalde grenzen kenmerkend voor de onderzochte stam. Sommige stammen vormden enkele, andere 300 à 400 L-kolonies per plaat. Van elke stam werd met behulp van een stereomicroscop in een serie van 4 - 6 platen het aantal L-kolonies geteld. Het hoogste aantal L-kolonies per plaat werd als kenmerkend voor het L-vormend vermogen van de onderzochte stam beschouwd. Beneden de 600 kolonies was de telling uitvoerbaar, daarboven werd het aantal geschat en uitgedrukt in veelvouden van het + teken. Een aantal L-kolonies dat geschat werd op 600 - 1000 werd aangegeven met ++, op 1000 - 4000 met +++, en op meer dan 4000 met ++++.

Uitkomsten

a. Invloed van enkele aminozuren op de L-inductie door penicilline en op de bacteriegroei

Glycine alleen had geen L-inducerende werking op groep A streptococci,

doch het bleek dat het L-inducerend effect van penicilline in hoge mate door glycine werd versterkt. Stam B 1 vormde onder invloed van penicilline ten hoogste 50 kolonies per plaat. In platen welke bovendien 0.75% - 1.25% glycine bevatten, nam dit aantal geleidelijk toe (Tabel 1) tot 750 kolonies. Bij stij-

Tabel 1

Invloed van toenemende concentraties glycine op het aantal L-kolonies gevormd door een stam groep A streptococci in aanwezigheid van penicilline en op de drooggewichten van die stam gekweekt in vloeibaar milieu zonder penicilline en zout.

Stam	Glycine % in de voedingsbodem	Aantal L-kolonies	Drooggewichten van de cocci in mg./ml.
B 1	Contrôle	50	0.348
	0.5 %	28	0.323
	0.75%	150	0.318
	1.0 %	500	0.263
	1.25%	750	0.116
	1.5 %	200	0.063

Het aantal L-kolonies gevormd door stam B 1 onder invloed van enkel penicilline in vele experimenten bedroeg nooit meer dan 50. Als basismilieu werd trypsine bouillon gebruikt.

gende glycineconcentratie nam de bacteriegroei af, hetgeen blijkt uit de afname van de drooggewichten van B 1 culturen, welke 0% - 1.5% glycine bevatten. De al te sterke remming van de bacteriegroei was mogelijk de oorzaak dat boven 1.25% glycine het aantal L-kolonies weer begon af te nemen.

De potentiërende L-inducerende werking ten opzichte van penicilline werd vervolgens onderzocht bij 8 bacteriestammen door toevoeging van 0.75% - 1.75% glycine aan de voedingsbodem. Tevens werd de werking van het aan glycine verwante DL-serine onderzocht (Tabel 2). Bij 1.25% - 1.5% glycine werden in alle gevallen hoge opbrengsten L-kolonies verkregen. DL-serine was werkzaam bij 5 van de 8 stammen. De hoogste opbrengsten werden meestal bij 1.5% - 1.75% verkregen. Stam B 4, B 6 en B 17 werden niet door DL-serine beïnvloed.

In een volgende experiment werd nagegaan in hoeverre het racemische mengsel en de isomeren van serine een verschil in activiteit vertoonden. Daartoe werden vier stammen (B 6, AED, GL 8 en ADA) gekweekt in voedingsbodems, welke naast penicilline 0.25% - 1.5% DL-, L- of D-serine bevatten. Het bleek, dat de potentiërende werking van serine ten opzichte van

Tabel 2

Invloed van verschillende concentraties glycine of DL-serine op het aantal L-kolonies afgezonderd bij 8 stammen groep A streptococcen.

Stam	B 1	B 4	B 6	B 7
Controle	+(50)	+(196)	+(66)	+(68)
<u>Glycine</u>				
0.75%	+(150)	+(400)	+(75)	++
1.0 %	+(500)	+++	+(150)	+++
1.25%	++	++++	+(300)	+++
1.5 %	+(200)	+++	++	++++
1.75%	n.o.	++	++	+++
<u>DL-Serine</u>				
0.75%	n.o.	geen	geen	+(350)
1.0 %	++	geen	+(68)	+(400)
1.25%	+++	geen	geen	+(165)
1.5 %	+++	geen	geen	+++
1.75%	n.o.	geen	geen	++

Stam	B 8	B 9	B 14	B 17
Controle	+(1)	+(27)	+(67)	+(101)
<u>Glycine</u>				
0.75%	+++	geen	+++	++
1.0 %	++	++	+(304)	+++
1.25%	++	++	++	+(106)
1.5 %	+++	+++	n.o.	+++
1.75%	++++	+++	n.o.	++++
<u>DL-Serine</u>				
0.75%	+(74)	+(5)	+(16)	+(124)
1.0 %	++	+(22)	geen	+(184)
1.25%	+(47)	+(110)	++	+(53)
1.5 %	++	++	n.o.	geen
1.75%	+++	+++	n.o.	geen

Gekweekt werd in TB agar met penicilline. De getallen tussen haakjes geven het juiste aantal L-kolonies in de platen weer. Het grootste aantal L-kolonies gevonden in 4 - 6 controleplaten, werd voor elke stam als controlegetal aangehouden. De schatting van het aantal L-kolonies werd als volgt weergegeven: + = 0 - 600, ++ = 600 - 1000, +++ = 1000 - 4000, ++++ = 4000 of meer kolonies, n.o. = niet onderzocht.

penicilline geheel aan D-serine kon worden toegeschreven (Tabel 3). Dit kwam het duidelijkst tot uitdrukking bij stam B 6. DL-serine had hier ook in hoge concentratie geen L-inducerende werking, terwijl bij 0.25% D-serine reeds een groot aantal L-kolonies ontstond. Van de L-isomeer werd geen effect gezien op het ontstaan van een normaal aantal L-kolonies.

Tabel 3

Invloed van verschillende concentraties van het racemische mengsel en van beide isomeren van serine op het aantal L-kolonies afgezonderd bij 4 stammen groep A streptococcen.

Stam		Serine		
		DL	L	D
B 6	Controle	+(66)	+(66)	+(66)
	0.25%	geen	+(1)	+++
	0.5 %	geen	geen	+++
	1.0 %	geen	geen	++++
	1.5 %	geen	+(47)	++++
AED	Controle	+(600)	+(600)	+(600)
	0.25%	+++	+(180)	+++
	0.5 %	+++	+(120)	+++
	1.0 %	++++	+(68)	++++
	1.5 %	++++	+(78)	++++
GL 8	Controle	+(174)	+(174)	+(174)
	0.25%	+(3)	geen	+++
	0.5 %	+(17)	geen	+++
	1.0 %	+(53)	geen	++++
	1.5 %	+++	geen	++++
ADA	Controle	+(400)	+(400)	+(400)
	0.25%	+(8)	geen	++
	0.5 %	+(25)	geen	+++
	1.0 %	+(89)	geen	++++
	1.5 %	++	geen	+++

Gekweekt werd in TB agar met penicilline. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.

De L-inducerende werking van threonine en alanine werd daarna onder dezelfde omstandigheden onderzocht. Blijkens Tabel 4 verschilden de uitkomsten bij theonine en serine slechts weinig van elkaar. DL-threonine werkte L-inducerend bij stam B 6 en L-threonine had een matige positieve werking op stam AED zonder dosis-effect relatie. Alanine daarentegen was onwerkzaam bij stam ADA en alleen in de hoogste concentraties effectief bij stam B 6 en GL.8. Bij herhaling werd gevonden dat zowel het racemische mengsel als beide isomeren van alanine ook in lage concentraties werkzaam waren bij stam AED (tabel 5).

De potentiërende L-inducerende werking van 0.25% - 1.5% van de racemische mengsels en de isomeren van methionine ten opzichte van penicilline werd onderzocht bij stam AED. Bovendien werd de troebeling bepaald, welke de coccen van dezelfde stam gaven na groei in vloeibaar medium zonder zout

Tabel 4

Invloed van verschillende concentraties van het racemische mengsel en van beide isomeren van threonine op het aantal L-kolonies afgezonderd bij 4 stammen groep A streptococci.

Stam		Threonine		
		DL	L	D
B 6	Controle	+(66)	+(66)	+(66)
	0.25%	n.o.	n.o.	n.o.
	0.5 %	++	+(67)	++
	1.0 %	+++	+(55)	+++
	1.5 %	+++	+(175)	+++
AED	Controle	+(600)	+(600)	+(600)
	0.25%	+++	++	+++
	0.5 %	++	++	++
	1.0 %	++	++	+++
	1.5 %	++	++	++++
Gl 8	Controle	+(174)	+(174)	+(174)
	0.25%	++	+(41)	++
	0.5 %	++	+(33)	+++
	1.0 %	++	+(20)	+++
	1.5 %	+++	+(87)	++++
ADA	Controle	+(400)	+(400)	+(400)
	0.25%	+(110)	+(400)	+++
	0.5 %	++	+(175)	+++
	1.0 %	+++	+(50)	++++
	1.5 %	++	+(80)	+++

Gekweekt werd in TB agar met penicilline. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.

of penicilline in aanwezigheid van 0.125% - 1% van dezelfde stoffen (Tabel 6 en Fig. 2). Er bleek een duidelijk verband te bestaan tussen de L-inducerende en de bacterieremmende werking bij verschillende percentages methionine. Het racemische mengsel en de D-isomeer werkten respectievelijk matig en sterk L-inducerend en bacterieremmend. L-methionine was in beide opzichten onwerkzaam.

De tot nu toe besproken aminozuren hadden allen een L-inducerend effect in aanwezigheid van penicilline, zij het dat de werking van D-aniline (uitgezonderd bij stam AED) minder uitgesproken was dan van de andere aminozuren. De voornaamste aminozuren, welke in de celwand van Gram-positieve bacteriën kunnen voorkomen zijn, zoals in het volgende hoofdstuk nog besproken zal worden, naast alanine, glutaminezuur, lysine of DAP en asparaginezuur. In de nu volgende proeven werd daarom onderzocht, in hoeverre de racemische mengsels en isomeren van deze stoffen - met uitzondering van DAP,

Tabel 5

Invloed van verschillende concentraties van het racemische mengsel en van beide isomeren van alanine op het aantal L-kolonies afgezonderd bij 4 stammen groep A streptococcen.

Stam		Alanine		
		DL	L	D
B 6	Controle	+(66)	+(66)	+(66)
	0.25%	+(130)	+(130)	+(192)
	0.5 %	+(120)	+(100)	+(140)
	1.0 %	+(210)	+(58)	+++
	1.5 %	+(15)	+(7)	+++
AED	Controle	+(600)	+(600)	+(600)
	0.25%	++	+(450)	+++
	0.5 %	+++	+++	+++
	1.0 %	+++	+++	+++
	1.5 %	++	+++	++++
Gl 8	Controle	+(174)	+(174)	+(174)
	0.25%	+(48)	+(45)	+(67)
	0.5 %	+(111)	+(30)	+(120)
	1.0 %	+(524)	+(36)	+(380)
	1.5 %	+(75)	+(46)	+++
ADA	Controle	+(400)	+(400)	+(400)
	0.25%	+(10)	+(7)	+(480)
	0.5 %	+(24)	+(8)	+(15)
	1.0 %	+(68)	+(9)	+(202)
	1.5 %	+(67)	+(2)	+(54)

Gekweekt werd in TB agar met penicilline. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.

waarvan de DD-isomeer niet voorhanden was - een potentiërend L-inducerende werking ten opzichte van penicilline hadden. In eerste aanleg werd verondersteld, dat de celwandaminozuren naar analogie van alanine weinig geschikt zouden zijn om bacteriën in hun L-phase te doen overgaan.

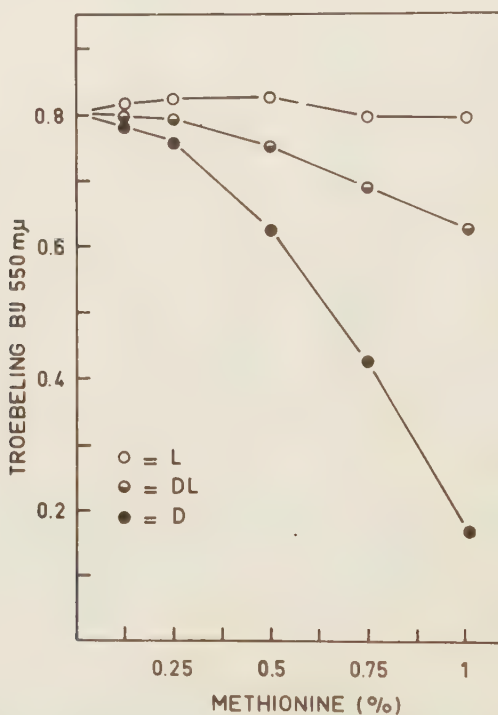
Bij deze en ook bij de volgende in dit hoofdstuk te beschrijven L-inductieproeven werd de trypsine bouillon agar vervangen door de Albimi voedingsbodem. Dit had tot gevolg, dat het aantal L-kolonies in de controleplaten hoger was, dan in de voorafgaande proeven. Dit is de reden waarom de controlewaarden welke voorkomen in Tabel 7 en volgende hoger zijn dan in de voorafgaande.

Tabel 6

Invloed van verschillende concentraties van het racemische mengsel en van beide isomeren van methionine op het aantal L-kolonies afgezonderd bij een stam groep A streptococcen.

Stam AED	Controle	Methionine		
		DL	L	D
		+(600)	+(600)	+(600)
	0.25%	++	+(1)	+++
	0.5 %	+++	+(1)	++++
	1.0 %	+++	+(4)	+++
	1.5 %	++++	+(3)	+++

Gekweekt werd in TB agar met penicilline. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.



Figuur 2. Invloed van het racemische mengsel en beide isomeren van methionine op de groei van groep A streptococcen. Gelijke inocula van een 18-uurscultuur van stam AED werden gekweekt in Heart Brain Infusion (Difco) verrijkt met 10% paardeserum. De invloed van verschillende concentraties van de drie stoffen op de bacteriegroei werd bepaald door meting van de troebelingen in een Unicam Spectrophotometer bij 550 mμ en bij maximale groei, d.w.z. na 14 uur bebroeden bij 37°C.

De potentiërende L-inducerende werking van de racemische mengsels en de isomeren van 0.25% - 1.5% glutaminezuur werd onderzocht bij stam AED en GL 8, van 0.5% en 1% lysine en 0.5% en 0.75% asparagine bij stam GL 8. Uit tabel 7 blijkt, dat het racemische mengsel en de D-isomeer van lysine wel, doch die van glutaminezuur en asparaginezuur niet L-inducerend werken.

Tabel 7

Invloed van verschillende concentraties van de racemische mengsels en van de isomeren van glutaminezuur, lysine en asparaginezuur op het aantal L-kolonies afgezonderd bij 2 stammen groep A streptococcen.

Stam		Glutaminezuur		
		DL	L	D
AED	Controle	++	++	++
	0.25%	++	++	++
	0.5 %	++	++	++
	1.0 %	++	++	+
	1.5 %	++	++	++
GL 8	Controle	++	++	++
	0.25%	++	++	++
	0.5 %	++	++	+(500)
	1.0 %	+	++	+(500)
	1.5 %	+(50)	+(30)	+(75)
GL 8	Lysine			
	Controle	++	++	++
	0.5 %	+++	+	++++
	1.0 %	+++	+	++++
GL 8	Asparaginezuur			
	Controle	++	++	++
	0.5 %	+	++	++
	0.75%	+	++	++

Gekweekt werd in AB agar met penicilline. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.

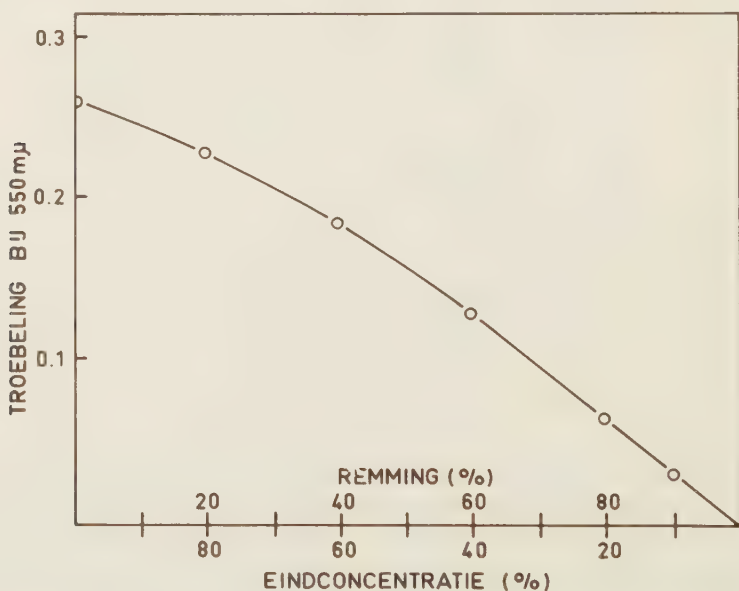
In een volgend experiment werd de invloed van 100 mmol/l. van de racemische mengsels en beide isomeren van alle onderzochte aminozuren op de groei van GL 8 bacteriën onderzocht. Een zestal 1 ml. controleculturen, dat wil zeggen zonder toevoeging van een aminozuur, bleken nagenoeg gelijke troebelingen te geven. Deze culturen werden samengevoegd, door in pipetten verdund en gemeten (Tabel 8A en Fig. 3). In Tabel 8B zijn de in dezelfde proef verkregen troebelingen van de aminozuurhoudende culturen weergegeven, alsmede de daarmee overeenkomende verdunningspercentages uit Fig. 3.

Tabel 8A

Troebelingen van stam GL 8 culturen bij maximale groei en na verdunning

(1)	(2)	
OD controle culturen	Eindconcentratie in %	OD
0.260	100	0.261
0.258	80	0.228
0.254	60	0.184
0.250	40	0.129
0.260	20	0.064
0.258	10	0.028

Stam GL 8 werd gekweekt in Todd-Hewitt Broth (Difco) verrijkt met 10% paardeserum. 1 ml. culturen werden beënt met 0,03 ml. van een 12-uurscultuur. Zes gelijke culturen gaven na 14 uur bebroeden bij 37° C troebelingen (OD) bij 550 m μ als onder (1). Deze werden samengevoegd, door in pipetteren verdund en opnieuw gemeten (2). Een onbeënte voedingsbodem werd gebruikt als blanco en als verdunningsvloeistof. De gegevens onder (2) werden in Fig. 3 in curve gebracht.



Figuur 3. Verdunningscurve van stam GL 8 cultuur. Voor toelichting zie onderschrift Tabel 8 A.

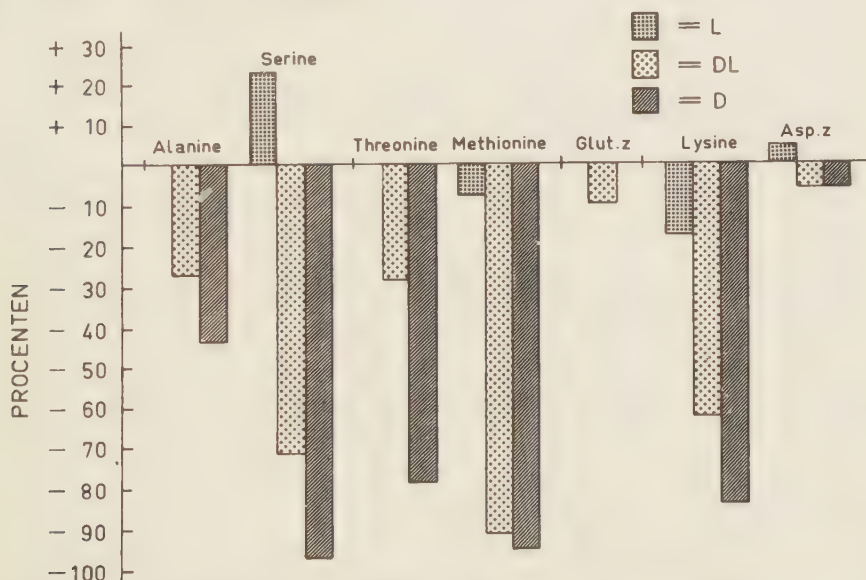
Tabel 8B

Invloed van enkele aminozuren op de groei van stam GL 8

Aminozuren	Troebeling			Remmings %		
	L-	DL-	D-	L-	DL-	D-
Alanine	0,263	0,213	0,172	0	27	44
Serine	0,335	0,093	0,011	22*	72	97
Threonine	0,264	0,208	0,072	0	29	79
Methionine	0,247	0,021	0,013	8	93	96
Glutaminezuur	0,258	0,244	0,259	0	10	0
Lysine	0,232	0,122	0,050	18	62	84
Asparaginezuur	0,271	0,251	0,250	4*	6	6

* Procentuele groeibevordering, berekend uit OD van de controlocultuur.

Voor techniek zie onderschrift Tabel 8A. De beënting geschiedde met dezelfde GL 8 cultuur als gebruikt in de aldaar vermelde serie. De concentratie van de verschillende aminozuren in de 1 ml. culturen bedroeg 100 mmol/l. Asparaginezuur werd in verband met de geringe oplosbaarheid bij 75 mmol/l. getest. De procentuele remming ten opzichte van de controlocultuur werd afgelezen uit Fig. 3, tenzij anders aangegeven.



Figuur 4. Grafische voorstelling van Tabel 8B. De groeiremmende of groeibevorderende werking van de racemische mengsels en van de isomeren van verschillende aminozuren werden uitgedrukt in procenten van de groeidichtheid van de controlocultuur. Voor de gebruikte techniek, respectievelijk concentratie, zie onderschrift Tabel 8A en 8B.

In Fig. 4 werden deze verdunningspercentages uitgedrukt als procentuele remmingen ten opzichte van de groeidichtheid van de controlecultuur. De matige groeibevorderende werking van L-serine en L-asparaginezuur werd rechtstreeks uit de controlewaarde berekend.

Uit Fig. 4 blijkt, dat GL 8 bacteriën in hun groei matig tot sterk geremd worden door 100 mmol/l. van het racemische mengsel en de D-isomeer van serine, threonine, methionine en lysine, doch niet door glutaminezuur en asparaginezuur. DL- en D-alanine hebben in deze concentratie een matige bacterieremmende werking. Bij herhaling van het experiment met stam AED ontstond eenzelfde patroon, met name ook wat betreft de invloed van alanine op de groei. De groeibevorderende werking van L-serine werd behalve in deze ook in andere, hier niet weergegeven, proeven gevonden. Wellicht kan hieruit worden afgeleid, dat Todd-Hewitt Broth L-serine deficiënt is voor de optimale groei van groep A streptococci.

b. Invloed van glycine op een reïncultuur van de L-phase

Nadat de potentiërende L-inducerende werking van glycine en penicilline was vastgesteld, rees de vraag welke invloed glycine had op de groei van reeds bestaande L-kolonies. Dit werd op de volgende wijze onderzocht. Uit een reïncultuur van de L-phase werden enkele blokjes agar met L-materiaal uitgesneden, in een steriele mortier fijngevrezen en met een weinig penicillinehoudende trypsine bouillon verdund. Gelijke volumina van het gehomogeniseerde materiaal werden vermengd met opgesmolten en tot 45°C afgekoelde voedingsbodems met en zonder glycine. Na bebroeden bleken de controleplaten meer L-kolonies te bevatten dan de glycineplaten. Werd dezelfde werkwijze herhaald, uitgaande van L-kolonies in glycinehoudend milieu, dan ontstonden eveneens meer L-kolonies in platen zonder glycine, dan met glycine. Hieruit werd afgeleid dat het effect van glycine en mogelijk ook van de andere aminozuren met L-inducerende werking beperkt bleef tot de L-inductie.

c. L-inducerende werking van D-cycloserine

CIARK en HAHN (1959) beschreven hoe onder invloed van D-cycloserine uit *Escherichia coli* protoplasten kunnen ontstaan. Gepoogd werd derhalve om een L-inducerende werking van deze stof op groep A streptococci aan te tonen. Daarbij werd gevonden dat, wanneer penicilline vervangen werd door D-cycloserine, bij de L-inductie van stam AED en GL 8 in trypsine agar een klein

aantal L-kolonies ontstond in de remzones van de platen. Bij herhaling van de proef in Albimi agar ontstonden door D-cycloserine bij beide stammen evenveel L-kolonies als door penicilline.

Het was eveneens mogelijk deze L-kolonies met D-cycloserine rein te kweken. De minimum concentratie van de stof waarbij bacterieremming optrad, bedroeg 250 µg/ml. en de maximum concentratie waarbij de L-kolonies nog overentbaar waren, 1000 µg/ml. De grenzen waarbinnen L-kolonies worden geïsoleerd en overgeënt waren dus voor D-cycloserine veel nauwer dan voor penicilline.

d. Invloed van serine en alanine op L-inductie door D-cycloserine of penicilline

Nadat aangetoond was (MICHEL en HIJMANS, 1960) dat de L-inducerende werking van D-cycloserine kon worden versterkt door glycine werd de werking van D-serine en D-alanine in dit opzicht onderzocht. Serine werd onderzocht omdat het in chemische zin een voorloper is van cycloserine en alanine, omdat door SHOCKMAN (1959) werd beschreven dat de D-isomeer van dit aminozuur de antibiotische werking van D-cycloserine opheft. De proef werd verricht in Albimi agar bij stam AED en GL 8, met de racemische mengsels en beide isomeren van serine en alanine enerzijds en D-cycloserine of penicilline anderzijds. De concentratie van de aminozuren in de voedingsbodem bedroeg telkens 1%. De uitkomsten van het experiment zijn weergegeven in Tabel 9. Daaruit blijkt dat zonder toevoeging van aminozuren aan de voe-

Tabel 9

Invloed van serine en alanine op de L-inductie in aanwezigheid van D-cycloserine of penicilline

Stam		Controle	Serine			Alanine		
			DL	L	D	DL	L	D
AED	D-Cycloserine Penicilline	++	+(75)	+(4)	++++	+(500)	geen	++
		+(350)	++	geen	++++	+++	++	+++
GL 8	D-Cycloserine Penicilline	++	+++	+(50)	++++	geen	geen	geen
		++	+++	+	++++	+++	++	+++

Gekweekt werd in AB agar. Daardoor was de opbrengst in de controleculturen hoger dan in de eerder beschreven proeven in TB agar. Beide aminozuren werden in een concentratie van 1% getest. Voor de verklaring van de symbolen zie Tabel 2.

dingsbodem D-cycloserine even werkzaam was als penicilline. Bij beide stammen bleek D-serine de werking van de twee antibiotica te versterken. D-alanine daarentegen versterkte wel de werking van penicilline, doch hief het effect van D-cycloserine geheel of gedeeltelijk op. De remzone door D-cycloserine was in de platen met D-alanine sterk verkleind.

Discussie

De L-inducerende werking van glycine welke beschreven werd door DIENES en ZAMECKNIK (1952) voor *Salmonella typhimurium* en *Haemophilus influenzae*, gold niet voor groep A streptococci. Uit eigen onderzoekingen kwam vast te staan dat deze stof wel de L-inducerende werking van penicilline bij streptococci aanzienlijk kon versterken. Behalve glycine werden ook de optische isomeren van een aantal andere aminozuren onderzocht op hun L-inducerend vermogen in aanwezigheid van penicilline. De uitkomsten hiervan en van het bacterieremmend vermogen van de onderzochte aminozuren werden samengevat in Tabel 10A. In Tabel 10B werd de optische configuratie van de aminozuren welke voorkomen in de celwand van groep A streptococci, aangegeven. De verantwoording voor de gegevens in Tabel 10B zal in Hoofdstuk IV worden gegeven.

Tabel 10 A. Schematisch overzicht van het bacterieremmend en L-inducerend effect van aminozuren op Groep A streptococci.

Aminozuren	Serine		Threonine		Methionine		Alanine		Glut.zuur		Lysine		Asp. zuur	
	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
Bacterieremmend effect	-	+	-	+	-	+	-	±	-	-	-	+	-	-
L-inducerend effect	-	+	-	+	-	+	-	±	-	-	-	+	-	-

Tabel 10 B. Aminozuren voorkomend in de celwand van Groep A streptococci.

Voorkomen in de wand	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
----------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

De plustekens in Tabel 10B geven de sterk in de celwand vertegenwoordigde aminozuren aan. De met het minteken aangegeven aminozuren zijn ofwel afwezig ofwel zwak vertegenwoordigd.

Uit Tabel 10A blijkt dat L-inductie alleen veroorzaakt werd door D-aminozuren met bacterieremmende werking. De matige L-inductie door D-alanine ging gepaard met een matig bacterieremmend effect van die stof. Bij verge-

lijking van Tabel 10A en 10B wordt bovendien de indruk verkregen dat D-aminozuren alleen L-inducerend en bacterieremmend kunnen werken, wanneer ze niet in de celwand voorkomen. Lysine vormt hierop een schijnbare uitzondering, daar dit aminozuur wel in de celwand voorkomt, doch niet als D-aminozuur. Asparaginezuur vormt een echte uitzondering op de regel, daar dit aminozuur noch in de celwand voorkomt, noch L-inducerend werkt. Het verdient echter de aandacht dat asparaginezuur op enkele wijzen met de samenstelling van de celwand in verband gebracht kan worden. Verschillende *Lactobacillus* species (CUMMINS en HARRIS, 1956, IKAWA en SNELL, 1960) en *Streptococcus faecalis* (TOENNIES, BAKAY en SHOCKMAN, 1959) bevatten naast alanine, lysine en glutaminezuur, D-asparaginezuur als belangrijk celwandbestanddeel. ROODYN en MANDEL (1960) verrichtten met behulp van asparaginezuur-4-C¹⁴ een onderzoek over de rol van dit aminozuur bij de celwandsynthese van *Bacillus cereus*. Bij deze bacterie zijn DAP, alanine en glutaminezuur de voornaamste aminozuren van de celwand. Wanneer tijdens het kweken van deze bacteriesoort in aanwezigheid van asparaginezuur-4-C¹⁴ de eitwitsynthese werd geremd door 8-azaguanine, kon het grootste deel van de specifieke activiteit worden teruggevonden in het DAP van de celwand. Asparaginezuur was in dit geval dus de voorloper van één van de celwandaminozuren. Bij experimenten welke beschreven zullen worden in Hoofdstuk V, werd een aanwijzing gevonden dat asparaginezuur bij groep A streptococci nog op andere wijze bij de celwandopbouw betrokken kan zijn. De nauwe samenhang welke D-asparaginezuur met de celwandstofwisseling heeft, zal wellicht nog eens in verband gebracht kunnen worden met het ontbreken van bacterieremming door dit aminozuur.

Wanneer de veronderstelling dat alleen die D-aminozuren welke niet in de celwand voorkomen, een potentiërende L-inducerende werking ten opzichte van penicilline hebben, juist is, dan kan verwacht worden dat andere D-aminozuren dan de hier onderzochte, wat hun werking betreft zullen overeenkomen met D-serine, D-threonine en dergelijke (Tabel 10A). Een L-inducerende werking wordt met name verwacht voor D-valine en D-leucine, waarvan FLING en FOX (1945) de bacterieremmende werking op *Lactobacillus arabinosus* beschreven. De beperkte oplosbaarheid stelt overigens een grens aan het aantal stoffen dat voor dit onderzoek in aanmerking komt, daar de werkzame concentraties betrekkelijk hoog waren.

Stam AED werd door 100 mmol/l. van de verschillende aminozuren op dezelfde wijze geremd als stam GL 8. Het is dus waarschijnlijk, dat een remmingspatroon zoals in Fig. 4 is weergegeven, typerend is voor groep A strep-

tococcon. Herhaling van het experiment met andere bacteriesoorten gaf weliswaar reproduceerbare, doch geheel andere uitkomsten. *Staphylococcus aureus* (stam Oxford) b.v. werd alleen door 100 mmol/l. D-serine, doch door geen enkel van de andere aminozuren geremd, ook niet door glycine. De bacterieremmende en waarschijnlijk ook de L-inducerende werking van aminozuren is dus wel degelijk afhankelijk van de bacteriesoort waarmee gewerkt wordt.

In Hoofdstuk I werden de redenen uiteengezet welke ertoe geleid hebben de L-phase op te vatten als structuren waarbij de celwand geheel of gedeeltelijk ontbreekt. PARK en STROMINGER (1957) toonden aan, dat een N-acetylaminosuikerhoudende voorloper van de celwand zich ophoopt, wanneer staphylococcon worden geïncubeerd met penicilline. Zij leidden hieruit af, dat de specifieke werking van penicilline berust op een remming van de celwandsynthese, en wel door blokkering van een transglycosidase aan de celmembraan, dat de overdracht van de celwandvoorloper op de celwand bewerkt. De verzwakking van de celwand welke hiervan het gevolg is, zal gewoonlijk leiden tot celdood door lysis. Wordt door bijzondere maatregelen lysis voorkomen, dan kunnen de cellen doorgroeien in de L-phase. PARK en STROMINGER (1957) hebben er terecht op gewezen dat het verschijnsel „L-phase” een bevestiging op biologisch niveau van hun waarnemingen inhield.

De selectief toxische werking van penicilline op de celwandsynthese van een aantal bacteriesoorten is tot nu toe niet geëvenaard en heeft de opmerkelijke potentiële scheiding tussen de stofwisseling van de cel en die van de celwand van bacteriën aan het licht gebracht.

De ophoping van de eerder genoemde celwandvoorloper bij *Staphylococcus aureus* door penicilline is inmiddels ook aangetoond voor bacitracine, glycine, oxytetracycline (PARK, 1958) en D-cycloserine (CIAK en HAHN, 1959). Het is daarom niet onredelijk om aan te nemen dat deze stoffen, mits ze niet toxisch zijn voor het cytoplasma, evenals penicilline ook L-inducerend zullen kunnen werken.

Het induceren van de L-phase van groep A streptococcon met behulp van bacitracine (GOODER en MAXTED, 1961) en de hier beschreven uitkomsten met glycine en D-cycloserine vormen een bevestiging van deze hypothese. In hoofdstuk V zal de nu voor de hand liggende vraag in hoeverre naast glycine ook D-aminozuren met L-inducerende werking de celwandvoorloper van bacteriën kunnen ophopen, worden besproken.

LARK en LARK (1959) induceerden door middel van penicilline en een aan-

tal D-aminozuren wat zij noemden „protoplast-like structures" van *Alcaligenes faecalis*. Een groot aantal D-aminozuren waren in dit opzicht werkzaam. Twee van de sterk in de celwand van deze bacteriesoort vertegenwoordigde aminozuren namelijk D-glutaminezuur en D-asparaginezuur en buitendien DL-proline hadden geen effect. De „protoplast-like structures" zijn groeiende doch zich niet-delende cellen, waarvan op morphologische gronden kan worden vastgesteld dat zij van normale cellen verschillen door een relatieve vermindering van het wandmateriaal per cel. Deze vermindering bleek te berusten op een afname van het gehalte van de voornaamste celwandaminozuren van *Alcaligenes faecalis* namelijk alanine, glutaminezuur, DAP en lysine. Deze gegevens zijn geheel in overeenstemming met de hypothese, dat sommige D-aminozuren evenals penicilline celwandsyntheseremmers zijn.

Het verdient verder de aandacht, dat de ringstructuur welke de kern van het penicillinemolecuul vormt ontstaat door condensatie van D-valine en D-cysteïne (DUBOS, 1958), terwijl D-aminozuren ook deel uitmaken van cyclische polypeptiden met antibiotische werking zoals gramicidine en tyrocidine (CHAIN, 1959).

Gewezen moet worden op de mogelijkheid dat het aangrijpingspunt van de veronderstelde remmende werking van D-aminozuren op de celwandsynthese niet, zoals bij penicilline, in de cellen behoeft gelegen te zijn. Het is namelijk denkbaar, dat de onnatuurlijke D-aminozuren de opname belemmeren van stoffen, welke noodzakelijk zijn voor de normale stofwisseling van de bacteriën, waardoor deze aminozuren bepaalde deficiënties veroorzaken. Dat deficiëntie kan leiden tot remming van de celwandsynthese, is aangetoond door STROMINGER en THRENN (1959), die een ophoping van celwandvoorlopers hebben vastgesteld bij staphylococcen welke waren gekweekt in een lysine-deficiënt medium (zie Hoofdstuk V). Indien dus bepaalde D-aminozuren lysine-deficiëntie zouden kunnen veroorzaken, zou een remming van de celwandsynthese hierdoor kunnen worden verklaard, terwijl een potentiërende remmende werking van penicilline op deze lysine-deficiënte cellen niet onaannemelijk is.

Inhibitie van de relatieve opname van aminozuren door Ehrlichse carcinoomcellen in aanwezigheid van een overmaat van hetzelfde aminozuur in het uitwendig milieu is onder andere aangetoond door PAINE en HEINZ (1960). Zij vonden dat de relatieve opname van bijvoorbeeld glycine door deze cellen werd geremd door een overmaat glycine in het medium en namen derhalve aan, dat in de celwand van de tumorcellen een verzadigbaar transportmechanisme voor glycine moest bestaan. De relatieve opname van glycine werd be-

halve door glycine ook geremd door een aantal andere aminozuren en daarmee verwante stoffen. Blijkbaar kon aan deze stoffen een affiniteit voor het glycine-transportmechanisme worden toegeschreven. Door Paine en Heinz werd verder onderzocht van welke structuureigenschappen de affiniteit voor het glycine-transportmechanisme afhankelijk was. Daarbij bleek, dat in het algemeen vervanging van de carboxylgroep en NH_2 groep in het glycinemolecuul de affiniteit voor het glycine-transportmechanisme verloren deed gaan.

Zo waren sarcosine, glycylglycine en ethanolamine niet in staat de relatieve opname van glycine te remmen. Van een reeks door hen onderzochte aminozuren bleken verder alanine, asparagine, α -aminoboterzuur, valine, norvaline, proline en methionine, glycine wel, doch asparaginezuur, glycine niet te kunnen vervangen. Glutaminezuur werd door hen niet onderzocht. Steeds bleek dat de L-isomeren van de werkzame aminozuren glycine effectiever kunnen vervangen dan de D-isomeren.

Bij een aantal niet weergegeven proeven werd hier gevonden, dat een trefende overeenkomst bestond tussen de affiniteit welke bepaalde stoffen hebben voor het glycine-transportmechanisme van Ehrlichse carcinoomcellen, en de invloed welke deze stoffen uitoefenen op de groei van groep A streptococcen. Op enkele uitzonderingen na bleek een positieve affiniteit steeds gepaard te gaan met een remmende werking op de bacteriegroei, zij het dat wat dit laatste betreft, alleen de D-isomeren werkzaam waren.

Deze waarnemingen geven steun aan de bovengenoemde hypothese, dat de werkzaamheid van D-aminozuren op bacteriën misschien niet rechtstreeks in de cellen plaats vindt, maar een gevolg zou kunnen zijn van de invloed die deze stoffen hebben op de doorlaatbaarheid van de wand van bacteriën. Ofschoon op het eerste gezicht het verschil tussen Ehrlichse carcinoomcellen en bacteriën als proefobject voor experimenten betreffende de permeabiliteit erg groot lijkt, moet op grond van bovengenoemde waarnemingen toch gewezen worden op de treffende overeenkomst in de uitkomsten welke onder bepaalde reserves toch in beide proefopstellingen werden verkregen.

Samenvatting

Een onderzoek werd ingesteld naar de L-inducerende werking van hoge concentraties aminozuren bij groep A streptococcen. Glycine zonder meer bleek geen L-inducerende eigenschappen te bezitten. De L-inducerende wer-

king van penicilline kon echter aanzienlijk worden versterkt door toevoeging van glycine aan de voedingsbodem. De D-isomeren van serine, threonine, methionine, lysine en in mindere mate van alanine, hadden een zelfde werking als glycine. D-glutaminezuur en D-asparaginezuur hadden echter onder gelijke omstandigheden geen invloed op het ontstaan van de L-phase. Het potentiërende L-inducerend effect van de onderzochte aminozuren en penicilline liep steeds parallel met het bacterieremmend vermogen van deze stoffen.

D-cycloserine bleek onder gunstige omstandigheden de L-inducerende werking van penicilline te evenaren. Dit antibioticum was echter vrij toxisch voor de L-phase, hetgeen het reinkweken van de L-kolonies bemoeilijkte. De L-inducerende werking van D-cycloserine kon aanzienlijk worden versterkt door glycine en D-serine, doch werd opgeheven door D-analine.

Gewezen werd op het feit dat de D-aminozuren welke in de wand van groep A streptococci voorkomen, namelijk alanine en glutaminezuur, weinig of niet L-inducerend en bacterieremmend werken. De bijzondere plaats welke D-asparaginezuur inneemt, daar het noch in de celwand voorkomt, noch bacterieremmend werkt, werd besproken.

Uit literatuurgegevens blijkt, dat de werking van penicilline, D-cycloserine en glycine op bacteriën vermoedelijk berust op een remming van de celwandsynthese. Op grond van de thans verkregen uitkomsten werd de hypothese geformuleerd dat de werking van D-aminozuren met een L-inducerend effect op groep A streptococci naar analogie van glycine eveneens op remming van de celwandsynthese berust.

Hoofdstuk IV

AMINOZUREN, AMINOSUIKERS EN SUIKERS VOORKOMEND IN DE
CELWAND VAN 26 STAMMEN GROEP A STREPTOCOCCEN*Vraagstelling*

In Hoofdstuk I werden de argumenten besproken welke geleid hebben tot de opvatting, dat de overgang van de bacteriële- naar de L-phase gepaard gaat met verlies van celwandsubstantie. De overgang in de L-phase komt in het algemeen tot stand onder invloed van penicilline. In Hoofdstuk III werd aangetoond, dat de L-inducerende werking van penicilline in hoge mate kan worden versterkt door die D-aminozuren welke niet in de wand van groep A streptococcen voorkomen. L-aminozuren en die D-aminozuren welke wel in de celwand voorkomen, hadden deze eigenschap niet. Het gedrag van stam AED was in dit opzicht afwijkend, daar bij deze stam L- en D-alanine bij herhaling een potentiërende L-inducerende werking ten opzichte van penicilline bleken te bezitten. Dit vormde de aanleiding om een onderzoek in te stellen naar het aminozuurpatroon van de celwand van stam AED.

SALTON (1956) en CUMMINS en HARRIS (1956) verzamelden gegevens over de samenstelling van de celwand van een groot aantal bacteriesoorten, doch tot op heden zijn hierover geen onderzoeken verricht bij meer dan enkele stammen van dezelfde bacteriesoort. Ten einde na te gaan in hoeverre bij verschillende stammen groep A streptococcen variaties kunnen voorkomen in de samenstelling van de celwand, werd deze behalve bij stam AED nog bij 25 andere stammen groep A streptococcen onderzocht. Ter controle werden twee stammen groep C en één stam groep E streptococcen in het onderzoek betrokken.

Van alle stammen werden behalve de aminozuursamenstelling van de celwand ook de in de celwand voorkomende suikers en aminosuikers bepaald. Van de voornaamste celwandaminozuren werd tevens de relatieve moleculaire verhouding vastgesteld. Bij de chromatografie van celwanden van Gram-positieve bacteriën worden altijd naast de vlekken van sterk vertegenwoordigde aminozuren een aantal zwakkere aminozuurvlekken gevonden. De vraag doet

zich voor, of de in de celwandpreparaten zwak vertegenwoordigde aminozuren inderdaad van de celwand afkomstig zijn, of dat zij een uiting zijn van de onvoldoende zuiverheid van het onderzochte materiaal. Bij stam AED werd daarom nagegaan welke invloed een verregaande zuivering van de celwanden uitoefende op het voorkomen van de zwak vertegenwoordigde aminozuren, ten einde vast te stellen of deze stoffen al dan niet deel uitmaken van de celwandstructuur.

Voorafgaande aan de bespreking van de gebruikte technieken en de verkregen resultaten zal een overzicht gegeven worden betreffende de isolering en de chemische samenstelling van de celwanden van Gram-positieve bacteriën, met name van groep A streptococci. De chemische samenstelling van de celwand van Gram-negatieve bacteriën zal slechts terloops ter sprake worden gebracht.

Litteratuuroverzicht

A. Inleiding

De celwand van bacteriën is gelegen tussen het celmembraan dat het cytoplasma omgeeft en een aantal oppervlaktestructuren, zoals kapsel en zweepdraden. Aan het oppervlak van de wand kunnen zich nog eiwitachtige stoffen bevinden, welke microscopisch niet van de wand zijn te onderscheiden, doch wel aantoonbaar zijn op grond van hun antigene eigenschappen zoals het M-, T- en R-eiwit bij groep A streptococci.

Terwijl reeds lang bekend was dat de oppervlakte-antigenen (LANCIEFIELD, 1943) en de daarbuiten gelegen celdelen niet noodzakelijk zijn voor de groei van bacteriën, heeft de ontdekking van de L-phase tot het inzicht geleid, dat ook de celwand in dezen niet onontbeerlijk is. De celwand heeft een starre structuur en bepaalt vermoedelijk daardoor de vorm van de bacterie. De starheid van de wand bracht met zich mee dat de isolering van celwanden van bacteriën pas mogelijk werd, nadat de middelen gevonden waren om de cellen te verbrijzelen of te laten springen.

Behalve star, zijn celwanden echter ook onoplosbaar in vele organische oplosmiddelen en in verdunde zuren in de koude (SALTON, 1951), hetgeen de zuivering van de celwanden in eerste instantie heeft vergemakkelijkt. De zure hydrolyse echter, welke daarna wordt toegepast om de celwanden te splitsen, heeft weliswaar de bouwstenen van de wand opgeleverd, doch geen inzicht verschaft in de juiste structuur van de celwand. Gegevens hieromtrent werden

tot nu toe hoofdzakelijk verkregen door de bepaling van het aangrijpingspunt van enzymen die celwanden van bacteriën kunnen aantasten (GHUYSEN, 1960. SALTON, 1960b, GHUYSEN en SALTON, 1960), terwijl te verwachten is dat in de naaste toekomst onderzoekingen over de biosynthese van de bacteriewand eveneens zullen bijdragen tot de kennis van de celwandstructuur.

B. Isolering van de celwand van Gram-positieve bacteriën

a. Verbrijzelen van bacteriën in aanwezigheid van glasparels

KING en ALEXANDER (1948) toonden aan dat het aantal levende bacteriën in bacteriesuspensies geschud in aanwezigheid van fijne glasparels, snel afneemt. DAWSON (1949) deelde daarna mede dat wanneer suspensies van *Staphylococcus aureus* gedurende één uur met glasparels (de zogenaamde Ballo-tini beads) worden getrild in een weefsel desintegrator, zoals door MICKLE (1948) werd beschreven, een groot deel van de cellen werd verbrijzeld. Deze methode is sindsdien toegepast voor het stuk trillen van een groot aantal bacteriesoorten (SALTON 1956, CUMMINS en HARRIS, 1956). In het algemeen worden 5 - 10 ml. bacteriesuspensies, welke 10 - 20 mg. bacteriedrooggewicht/ml. bevatten, met gelijke volumina glasparels (diameter 0.12 - 0.15 mm.) in de twee glazenhouders van de weefseldesintegrator, al naar gelang de bacteriesoort, gedurende 10 - 60 minuten getrild. Door SHOCKMAN, KOLB en TOENNIS (1957) en door HAYASHI en BARKULIS (1959) werden voor het verbrijzelen van bacteriën schudapparaten gebruikt welke een grotere capaciteit hebben dan de Mickle desintegrator.

Behalve door mechanische trillingen kunnen bacteriën ook verbrijzeld worden door middel van sonore en ultrasonore trillingen. Deze trillingen zijn in het algemeen weinig werkzaam bij het verbrijzelen van coccen (SALTON, 1953). ROBERSON en SCHWAB (1960) toonden echter aan, dat ultrasonore trillingen wel werkzaam kunnen zijn bij het verbrijzelen van streptococcen, mits dit geschiedt in aanwezigheid van glasparels.

De mate van verbrijzeling van de bacteriën door de verschillende soorten trillingen kan worden bepaald in het Gram-preparaat, in welk geval verbrijzelde Gram-positieve coccen zich manifesteren als egaal Gram-negatief materiaal en door middel van phasecontrastmicroscopie. Absolute zekerheid over de toestand van het materiaal kan alleen met behulp van elektronenmicroscopisch onderzoek worden verkregen. Het aantal coccen dat de trillingen uiteindelijk weerstaat, varieert volgens de verschillende auteurs tussen 0.1 en 1%.

b. Bereiding van celwanden uit verbrijzelde cellen

Voor het verkrijgen van de ver gezuiverde celwanden uit de getrilde bacteriesuspensie worden daaruit eerst door middel van differentieel centrifugeren de glasparels en de overgebleven intacte cellen verwijderd. Deze methode heeft als nadeel dat daarbij ook veel celwandmateriaal wordt neergeslagen. Het materiaalverlies kan worden beperkt door de suspensies af te draaien in een vloeibaar tweefasensysteem van wateroplosbare polymeren (ALBERTSON, 1958) of in een sucrose-gradiënt (ROBERSON en SCHWAB, 1960).

Wanneer het materiaal in dit stadium van de bewerking, mede ter uitsluiting van de aanwezigheid van nog intacte cellen, electronenmicroscopisch wordt onderzocht, blijken de celwanden te bestaan uit lege hulzen, waarop en waartussen cytoplasmaresten voorkomen. De celwanden van sommige bacteriesoorten kunnen hiervan worden bevrijd door herhaalde wassingen in gedestilleerd water, doch wassingen in fysiologisch zout of in M/10 fosfaatbuffer (SALTON, 1951, McCARTY, 1952) zijn in dit opzicht veel werkzamer. McCARTY (1952) stelde vast, dat 1/3 van de contaminerende eiwitten en nucleïnezuren van de celwanden van groep A streptococci konden worden verwijderd door herhaalde wassingen in fysiologisch zout en het overige deel door het materiaal te incuberen met ribonuclease en trypsine. Aangenomen kan worden dat trypsine behalve cytoplasma-eiwit ook het eventueel nog aanwezige type-specifieke M-eiwit dat zich aan het oppervlak van de cellen bevindt, in oplossing brengt (LANCEFIELD, 1943, SALTON, 1953, BARKULIS en JONES, 1957). CUMMINS en HARRIS (1956) zuiverden de celwanden van een groot aantal bacteriesoorten, waaronder groep A streptococci, door de verbrijzelde en gewassen cellen achtereenvolgens met ribonuclease en trypsine en met pepsine te behandelen. ROBERSON en SCHWAB (1960) zuiverden celwanden van dezelfde bacteriesoort met papaiïne, daar zij meenden dat dit enzym effectiever werkt dan de eerder genoemde enzymen. De aanwezigheid van storend kapselmateriaal bij de isolering en de zuivering van celwanden kan worden vermeden, indien wordt uitgegaan van bacterieculturen welke ouder zijn dan 12 - 16 uur (BARKULIS en JONES, 1957).

Het drooggewicht van gezuiverde celwanden bedraagt ongeveer 20% van het drooggewicht van de bacterie. De celwanden van Gram-positieve bacteriën zijn ongeveer 15 - 20 m μ dik en hebben in tegenstelling tot de celwanden van Gram-negatieve bacteriën, waarin electronenmicroscopisch een enkele maal macromoleculen of concentrische lagen zijn gevonden, een homogene structuur.

c. Isolering van celwandfracties door middel van extractie

De oudste methode voor de bereiding van de celwandfractie van bacteriën berustte op een extractie van de cellen in alkalisch milieu. Op grond van het electronenmicroscopisch beeld en de chemische samenstelling van de daarbij verkregen residu's is echter gebleken, dat de celwanden zelf ook door de extractievloeistof worden aangetast. Dit maakt de betrouwbaarheid van deze methodiek enigszins onzeker en zij wordt dan ook weinig meer toegepast (KANDLER, HUND en ZEHENDER, 1958). Gebruik makend van het toegenomen inzicht in de samenstelling van de celwand van bacteriën hebben PARK en HANCOCK (1960) onlangs een getrapte extractiemethode uitgewerkt voor *Staphylococcus aureus*. Door de cellen successievelijk te extraheren met trichloorazijnzuur in de koude, aethanol en trichloorazijnzuur in de warmte, en ze daarna te incuberen met trypsine, wordt een residu van een belangrijk deel van de celwand, namelijk het mucopeptide, verkregen. Het extract, verkregen met trichloorazijnzuur in de warmte, bevat behalve de afbraakproducten van nucleïnezuur, het zogenaamde teichinezuur¹⁾, dat eveneens een belangrijk deel van de celwand van deze bacteriesoort vormt. De auteurs zijn van mening dat deze methodiek, welke boven de mechanische desintegratie het voordeel heeft gelijktijdig verschillende voor onderzoek bruikbare celfracties te verschaffen, ook zeer goed bij andere bacteriesoorten zou kunnen worden toegepast.

C. Chemische samenstelling

Uit onderzoekingen welke de laatste jaren zijn verricht over de samenstelling van de celwand van Gram-positieve bacteriën, is gebleken, dat deze in hoofdzaak is opgebouwd uit polymeren die een beperkt aantal aminozuren, aminosuikers en suikers bevatten. Daarnaast kan in de celwand van verschillende bacteriesoorten een wisselende hoeveelheid phosphor aangetoond worden, welke gebonden is als glycerophosphaat of als ribitolphosphaat (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN en CARSS, 1958). De ontdekking van het voorkomen van deze zogenaamde teichinezuren in de celwand van een aantal bacteriesoorten is van recente datum en heeft de benaming „mucocomplex" of „mucopeptide", welke voor de celwandpolymeren tot nu toe gebruikelijk was, tot een minder juiste gemaakt. In afwachting van een aanvaardbare benaming voor de celwandpolymeren, zal hier de door WORK (1957) voorgestelde term grondstructuur („basic structure") van de celwand worden gebruikt.

1) Prof. Dr. P. E. Verkade te Delft stelde voor teichoic acid in het Nederlands teichinezuur te noemen.

De gezuiverde celwand van Gram-positieve bacteriën is bijna geheel uit deze grondstructuur opgebouwd. Lipiden vormen slechts een klein deel van de wand. Nucleïne-zuren ontbreken geheel (SALTON, 1951), doch worden wel gemakkelijk door de wand geabsorbeerd bij lage pH (BARKULIS en JONES, 1957). WEIDEL, FRANK en MARTINI (1960) hebben kunnen aantonen, dat in de celwand van de Gram-negatieve *E. coli* bacteriën drie lagen voorkomen. De starre binnenste laag wordt hierbij eveneens gevormd door de grondstructuur, welke merkwaardigerwijze netvormig om de cellen heen ligt. De twee daarbuiten gelegen lagen, welke tezamen 90% van de wand uitmaken, bestaan uit respectievelijk liposacchariden en lipoproteïnen.

De bouwstenen welke door zure hydrolyse uit de grondstructuur van een groot aantal bacteriesoorten (SALTON, 1953, CUMMINS en HARRIS, 1956) vrijkomen, zullen thans in het kort worden besproken.

a. aminozuren

De voornaamste aminozuren welke in de grondstructuur bij Gram-positieve bacteriën voorkomen zijn alanine, glutaminezuur, lysine en diaminopimelinezuur (DAP). Van de laatste twee is er steeds slechts één aanwezig. DAP is door WORK (1951) voor het eerst aangetoond in celwanden van bacteriën en komt verder alleen sporadisch in de plantenwereld voor. Een betrekkelijk grote hoeveelheid glycine is verder aangetoond in de celwand van staphylococci, terwijl asparaginezuur kwantitatief sterk vertegenwoordigd is in de celwand van lactobacillen en ook eenmaal aangetoond werd in de wand van een stam van *Streptococcus faecalis* (TOENNIES, BAKAY en SHOCKMAN, 1959).

De relatieve moleculaire verhouding waarin alanine ten opzichte van glutaminezuur en lysine of DAP in de celwand van verschillende bacteriesoorten voorkomt, bedraagt 2 : 1 : 1 tot 4 : 1 : 1 (SALTON en PAVLIK, 1960). HAYASHI en BARKULIS (1959) vonden in de celwand van een stam groep A streptococci een relatieve moleculaire verhouding van alanine : glutaminezuur : lysine, 4 : 1 : 1 en TEPPER, HAYASHI en BARKULIS (1960) bij twee stammen van dezelfde bacteriesoort een verhouding van 3,6 : 1 : 1. Laatstgenoemde wezen tevens op het voorkomen van een kleine hoeveelheid van een achttal andere aminozuren in de gezuiverde celwanden van de door hen onderzochte stammen. Asparaginezuur was onder deze aminozuren het sterkst vertegenwoordigd. SALTON (1953) vond tenslotte in de celwandhydrolysaten van onder meer *Streptococcus faecalis* enkele ninhydrine positieve vlekken welke niet berustten op de aminozuren welke gewoonlijk in eiwitten gevonden worden.

Uitgaande van de waarneming dat D-alanine noodzakelijk is voor de voeding van lactobacillen hebben SNELL, RADIN en IKAWA (1955) en IKAWA en SNELL (1956) voor het eerst aangetoond, dat alanine en glutaminezuur in tegenstelling tot lysine voor een deel in de D-configuratie in de grondstructuur van de celwand kunnen voorkomen. Zij vonden dat in celwanden van lactobacillen alanine voor 54% en glutaminezuur voor 65% als D-isomeer aanwezig is. PARK en STROMINGER (1957) en STROMINGER, PARK en THOMPSON (1959) vonden in celwanden van *Staphylococcus aureus* stam Kopenhagen 67% van het alanine en 100% van het glutaminezuur in de D-vorm. Het DAP van de celwand komt meestal in de meso-vorm en een enkele maal als de LL-isomeer voor (WORK, 1957). Het voorkomen van D-glutaminezuur in de celwanden van bacteriën is opmerkelijk, daar deze stof behalve in het kapsel van miltvuurbacteriën (IVANOVICS en BRUCKNER, 1937) nog niet eerder in de natuur werd aangetroffen.

Kwantitatieve gegevens over het aandeel dat de aminozuren van de grondstructuur hebben in de samenstelling van de celwand, zijn schaars en wisselen met de bacteriesoort. Volgens HANCOCK (1958) en HAYASHI en BARKULIS (1959) vormen zij respectievelijk 24% en 53% van het gewicht van de celwand van *Staphylococcus aureus* en groep A streptococcen.

b. aminosuikers

In de hydrolysaten van de gezuiverde celwanden van alle tot nu toe onderzochte bacteriesoorten komen twee aminosuikers voor, nl. glucosamine en muraminezuur. Bij enkele bacteriesoorten kon bovendien galactosamine aangetoond worden.

Het muraminezuur is evenals D-glutaminezuur en DAP voor het eerst aangetoond in celwanden van bacteriën. Het is een 3 - 0 - α - carboxyethylhexosamine (STRANGE, 1956, KENT, 1957, STRANGE en KENT, 1959) en komt evenals beide andere aminozuren in geacetyleerde vorm in de celwand voor (McCARTY, 1952, SALTON, 1954). Door de aanwezigheid van een carboxylgroep en een reducerende groep in het muraminezuurmolecuul, is deze stof mogelijk de schakel tussen de in de wand voorkomende peptiden enerzijds en suikers en aminosuikers anderzijds.

De aminosuikers vormen bij verschillende Gram-positieve bacteriën 10 - 30% van het drooggewicht van de celwand. Bij groep A streptococcen bedraagt deze hoeveelheid 20 - 25% (McCARTY, 1952, HAYASHI en BARKULIS, 1959).

c. suikers

Tot de suikers welke in de celwandhydrolysaten zijn gevonden, behoren naast de hexosen glucose, galactose en mannose, de ongebruikelijke pentose arabinose en de methylpentose rhamnose. Het patroon van de suikers voorkomend in de celwanden van bacteriën, is kenmerkend voor de soort en kan daarom van waarde zijn voor de taxonomie van moeilijk te classificeren bacteriestammen (CUMMINS en HARRIS, 1956). Rhamnose is aangetoond in de celwanden van alle soorten behorende tot het genus *Streptococcus*, en wel als enige bij respectievelijk groep A en groep C streptococcen. BARKULIS en JONES (1957) stelden vast, dat rhamnose bij groep A streptococcen in de L-configuratie voorkomt, terwijl het rhamnosegehalte van de celwand 20% bedraagt (HAYASHI en BARKULIS, 1959).

d. teichinezuren

BADDILEY, BUCHANAN en CARSS (1958) hebben aangetoond dat in de cellen van *Lactobacillus arabinosus* ribitolphosphaat en glycerolphosphaat voorkomen. Aangezien het ribitolphosphaat, dat nog niet eerder in de natuur was aangetroffen, aanvankelijk alleen in de celwand leek voor te komen, hebben zij voor de polymeren van deze stof de naam teichinezuur (teichoic acid) voorgesteld. Toen later bleek, dat ook polymeren van het veelvuldig voorkomend glycerolphosphaat in celwanden kunnen voorkomen, werd de betekenis van het begrip teichinezuur ook tot deze polymeren uitgebreid (ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN, DAVISON, KELEMEN en NEUHAUS, 1959). De teichinezuren van verschillende bacteriesoorten bevatten alle D-alanine, dat in alkalisch milieu afgesplitst kan worden, en verder glucose of N-acetylglucosamine. Het teichinezuur van *Staphylococcus aureus*, stam H, bevatte daarentegen geen hexose. Kwalitatieve gegevens over het voorkomen van teichinezuren in celwanden van een aantal bacteriesoorten werden medegedeeld door BADDILEY, BUCHANAN en CARSS (1958), SALTON en MARSHALL (1959), IKAWA en SNELL (1960), BADDILEY en DAVISON (1961) en IKAWA (1961). *Lactobacillus casei*, *Micrococcus lysodeicticus* en *Escherichia coli* zijn tot nu toe de enige bacteriesoorten waarbij in de celwand geen teichinezuur gevonden werd. Voor groep A streptococcen bestaan hierover geen mededelingen, doch het is wel aangetoond, in de celwand van *Streptococcus faecalis* (IKAWA, 1961).

e. celwand-antigenen

Evenals verschillende andere bacteriesoorten kunnen bacteriën behorende tot de genera *Streptococcus*, *Lactobacillus* en *Corynebacterium* ingedeeld worden in serologische groepen op grond van de antigene eigenschappen van

extracten, welke op verschillende wijzen uit de cellen kunnen worden bereid (LANCEFIELD, 1933, FULLER, 1938, MAXTED, 1948). Groep A streptococcen en *Corynebacterium mitis* kunnen verder onderverdeeld worden in typen op grond van de antigene eigenschappen van eiwit, dat zich aan de oppervlakte van de celwand bevindt (LANCEFIELD, 1943, CUMMINS, 1954).

McCARTY (1952) toonde aan dat het groepsantigeen, dat door MAXTED (1948) met behulp van *Streptomyces albus* enzym uit groep A streptococcen was verkregen, is gelocaliseerd in de celwand. Het niet proteolytische deel van dit enzym systeem bleek namelijk in staat een polysaccharide uit gezui-verde celwanden te kunnen vrijmaken, dat in antigene eigenschappen met het celextract van Maxted overeenkwam.

De extractiemethode met het *Streptomyces* enzym is uitvoerbaar voor het verkrijgen van het antigeen bij groep A, C en G streptococcen. Het antigeen van groep C en groep G streptococcen is daarom vermoedelijk eveneens in de celwand gelocaliseerd. Dat dit niet altijd het geval is blijkt uit de mededelingen van ELLIOTT (1959, 1960) en JONES en SHATTOCK (1960), welke aan-toonden dat het antigeen van groep D streptococcen niet in de celwand, doch in de celinhoud voorkomt.

BADDILEY en DAVISON (1961) verkregen enkele aanwijzingen, dat de in de celwand van lactobacillen voorkomende teichinezuren eveneens antigene eigenschappen bezitten en wel op grond van het feit, dat er een zekere mate van overeenstemming bestond tussen de aard van de gevonden teichinezuren en de groepsantigenen van de onderzochte stammen.

Techniek

Stammen. De herkomst van stam AED (type 12), GL 8 (type 19), ADA (type 14) en B 6 (type 11.27.44) werd beschreven in Hoofdstuk II. De overige stammen waren alle afkomstig van het Streptococcus and Staphylococcus Reference Laboratory¹⁾. Onderzocht werden de volgende stammen groep A streptococcen²⁾: M-proteïne dragende stammen type 1 (NCTC 8198), 2 (NCTC 8322), 3 (NCTC 9994), 4 (NCTC 8326), 5, 8 (NCTC 8324), 9, 11, 12, 14, 17 (NCTC 8304),

1) Dit laboratorium is een afdeling van het Central Public Health Laboratory, Colindale Avenue, London, N.W.9. Het hier beschreven onderzoek werd voor een deel in dit laboratorium verricht in samenwerking met Dr. H. Gooder. De auteur genoot hiervoor de financiële steun van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek.

2) De van een NCTC nummer voorziene stammen zijn als zodanig gecatalogiseerd in de National Collection of Type Cultures, Colindale Avenue, London, N.W.9.

23 (NCTC 8301), 24 (NCTC 8305), 25, 27, 30; T-proteïne doch geen M-proteïne dragende stammen type 2 T (NCTC 8322), 3.13T (een impetigo veroorzakende stam) en 5.27 T; een stam die het type 12 M antigeen en het type 10 T antigeen draagt (afgekort 12/10); een stam type 14 (genaamd Lowe, NCTC 8199) en een variant daarvan, welke twee M-antigenen draagt, namelijk van type 14 en 51, afgekort 14/51 (WILEY en WILSON, 1961). Als controles werden twee stammen groep C en één stam groep E streptococci gebruikt. Eén van de groep C stammen werd bij de mens geïsoleerd en is drager van het T antigeen type 2; de andere stam werd bij een dier geïsoleerd (C anim.).

Isolering en zuivering van de celwanden. Alle stammen werden gedurende 48 uur bij 37°C gekweekt in 2 l. Oxoid Nutrient Broth (Code nummer C.M.1, Oxo Ltd., London). Enkele ml. van de cultuur werden telkens afgezonderd voor het controleren van de reinheid van de cultuur en van het type van de betreffende stam. De rest van de cultuur werd gecentrifugeerd en na twee maal wassen in aqua destillata gesuspenderd in 25 ml. aqua destillata. Van één ml. van deze suspensies werd telkens na drogen *in vacuo* boven P_2O_5 het drooggewicht bepaald. Het gemiddelde drooggewicht van alle suspensies bedroeg 16 mg./ml., een dichtheid welke gunstig geacht kan worden voor het verbrijzelen van een hoog percentage van de cellen. De behandeling van de suspensies verliep verder als volgt.

De twee houders van het Mickle apparaat¹⁾ werden elk met 6 ml. suspensie en een even groot volume glasparsels²⁾ (diameter 0.12 - 0.15 mm.) gevuld. Hieraan werd telkens een druppel tri - n - butylphosfaat toegevoegd om schuimvorming tegen te gaan. De rubberstoppen, welke de houders afsluiten werden beschermd met cel'ophaan om afschilferen te voorkomen. De mate van verbrijzeling van de cellen werd na 30 minuten trillen op maximale sterkte beoordeeld in het Gram-preparaat. Wanneer meer dan enkele cocci per gezichtsveld zichtbaar waren, werden de suspensies opnieuw gedurende één à twee maal een kwartier getrild. Dit was slechts zelden nodig. Na het trillen van de cellen werden de suspensies van verbrijzelde cellen afgepipetteerd en de glasparsels in het Mickle apparaat gedurende twee maal 5 minuten gewassen. Na toevoegen van de wasvloeistof aan de suspensie werden de celwanden neergeslagen en tweemaal gewassen in aqua destillata in de Spinco L bij 4°C door telkens 30 minuten centrifugeren bij 10.000 toeren per minuut (11.700 x g). Het hierbij verkregen sediment werd vervolgens gesuspenderd in 25 ml.

1) Het Mickle apparaat werd vervaardigd door H. Mickle, Mill Works, Goms-hall, Surrey, England.

2) Gebruikt werden grade 12 glasparsels, afkomstig van English Glass Company Ltd., Empire Road, Leicester, England.

M/10 fosfaatbuffer met een pH van 7.9. De suspensie werd daarna tweemaal gedurende drie uur geïncubeerd bij 37° C na toevoegen van respectievelijk ribonuclease en trypsine, beide in een concentratie van 1 mg./ml. De celwanden werden tenslotte driemaal gewassen in aqua destillata en gedroogd boven P₂O₅ *in vacuo*.

In een afzonderlijke proef werd opnieuw celwandmateriaal van stam AED bereid ten einde na te gaan of een verregaande zuivering van het materiaal invloed had op de aminozuursamenstelling van de wand. Stam AED werd gedurende 24 uur bij 37° C gekweekt in 6 l. Todd-Hewitt Broth. De reinheid van de cultuur werd gecontroleerd in het Gram-preparaat en door enting op een bloedplaat. Na afdraaien en viermaal wassen in aqua destillata werden de cellen gesuspenderd in 55 ml. aqua destillata. Het drooggewicht van deze suspensie bedroeg 30 mg./ml. Vijf ml. volumina van deze suspensie werden met even grote volumina glasparsels gedurende 45 minuten getrild op de hierboven beschreven wijze. De controle op de aanwezigheid van intacte cellen geschiedde door middel van phasecontrastmicroscopie met een vergroting van 1400 x. Bovendien werd na het trillen van de cellen en na elke volgende bewerking electronenmicroscopisch onderzoek van het materiaal verricht.

De afzondering en de zuivering van de celwanden uit de suspensie van de getrilde cellen verliep als volgt: de glasparsels werden neergeslagen door 5 minuten afdraaien bij 1000 toeren per minuut. Voor het neerslaan van de niet verbrijzelde cellen werd de suspensie daarna gedurende 30 minuten bij 3000 toeren per minuut afgedraaid. De bovenstaande suspensie werd vervolgens vijf maal gewassen in aqua destillata, éénmaal in fysiologisch zout en éénmaal in M/20 fosfaatbuffer door telkens 40 minuten afdraaien bij 12000 toeren per minuut (18000 x g). Bij de eerste vijf wassingen bestond het sediment telkens uit drie lagen, namelijk een zwartgekleurde onderlaag, een witte middenlaag en een onscherpe bovenlaag. Voor de wassingen werden alleen de bovenste twee lagen benut. Opvallend was het ontbreken van de onscherpe bovenlaag bij de laatste twee wassingen. Dit materiaal was blijkbaar wel oplosbaar in fysiologisch zout, doch niet in water.

Het verkregen sediment werd tenslotte gesuspenderd in 20 ml. M/20 fosfaatbuffer pH 7.7 en onder schudden gedurende twee maal 2½ uur geïncubeerd bij 37° C met respectievelijk 6 mg. ribonuclease en 16 mg. trypsine. De suspensie werd daarna éénmaal gewassen in M/20 fosfaatbuffer, tweemaal in aqua destillata en in drie gelijke delen verdeeld. De eerste portie werd na vier maal wassen in aqua destillata gedroogd *in vacuo* boven P₂O₅. Het droog-

gewicht bedroeg 35 mg. De tweede portie werd gesuspenderd in 8 ml. 0.02 N HCl. Na toevoegen van 5 mg. pepsine werd deze portie onder schudden gedurende 17 uur geïncubeerd bij 37° C, drie maal gewassen in aqua destillata en gedroogd. Het drooggewicht bedroeg 29.3 mg. De derde portie werd gesuspenderd in 8 ml. fosphaatbuffer. Na toevoegen van 3 mg. papaine werd deze portie onder schudden gedurende 5 uur geïncubeerd bij 37° C, drie maal gewassen in aqua destillata en gedroogd. Het drooggewicht bedroeg 41 mg. Van de oorspronkelijke 1650 mg. cellen werd dus ongeveer 100 mg. aan celwandmateriaal overgehouden.

Hydrolyse. Voor de chromatographische analyse van de aminozuren en de aminosuikers van de celwand werd telkens 7.5 mg. droog celwandmateriaal met 5 ml. 6 N HCl in een dichtgesmolten buis gedurende 16 uur bij 108° C verhit. De drie porties afkomstig van stam AED werden onder dezelfde omstandigheden gedurende 20 uur bij 100° C verhit.

Voor het verwijderen van het HCl werd de inhoud van de buizen na afkoelen, met enkele ml. aqua destillata overgebracht in kleine petrischalen met een diameter van 5 cm en tweemaal ingedampt boven een kokend waterbad. De petrischalen werden vervolgens uitgewassen met enkele ml. aqua destillata, het humine afgefiltreerd en het filtraat tweemaal gedroogd boven NaOH *in vacuo*. De droge stof werd tenslotte opgelost in 0.4 ml. aqua destillata en in bevroren toestand bewaard.

Voor de chromatographische analyse van de suikers van de celwand werd 20 mg. celwandmateriaal met 2 ml. 0.5 N H₂SO₄ in een dichtgesmolten buis gedurende twee uur verhit bij 100° C. Na afkoelen werd aan de inhoud van de buizen een verzadigde oplossing van Ba(OH)₂ toegevoegd tot een pH van 7 à 7.3 was bereikt. De hydrolysaten werden vervolgens afgedraaid en het neerslag tweemaal gewassen met enkele ml. aqua destillata. Het hydrolysaat en de wasvloeistof werd telkens bijeengevoegd en gedroogd boven P₂O₅ *in vacuo*. De droge stof werd opgelost in 0.25 ml. aqua destillata en in bevroren toestand bewaard.

Chromatographie. De aminozuren, aminosuikers en suikers werden door middel van tweedimensionale afdalende chromatographie op Whatman N° 1 papier (40 x 30) gescheiden. Als oplosmiddelen werden achtereenvolgens gebruikt n-butanol; azijnzuur; water, in de verhouding 6 : 1 : 2 en een mengsel van 2/4 en 2/5 lutidine en water, in de verhouding 13 : 7, elk met een looptijd van 20 uur. Voor het aantonen van aminozuren en aminosuikers enerzijds en

suikers anderzijds werden respectievelijk 0.01 en 0.02 ml. van de betreffende hydrolysaten op het papier gebracht. Voor het kleuren van de aminozuren en aminosuikers werden de chromatogrammen na drogen bespoten met 0.3% ninhydrine in 95% alcohol en vervolgens gedurende 10 minuten verhit bij 70° C. De suikers werden gekleurd volgens PARTRIDGE (1949) door de chromatogrammen te bespuiten met een oplossing van 0.93% aniline en 1.6% phtaalzuur in met water verzadigde n-butanol en zedaarna gedurende 5 minuten bij 105° C te verhitten. Aminosuikers en N-acetylaminosuikers, voor zover aanwezig, werden onder deze omstandigheden eveneens gekleurd. De identiteit van de meeste vlekken kon worden vastgesteld door de loopsnelheid van de daarvoor in aanmerking komende stoffen te bepalen in dezelfde oplosmiddelen¹⁾.

De relatieve moleculaire verhouding van lysine, glutaminezuur en alanine in de celwand werd bepaald volgens de methode aangegeven door KAY, HARRIS en ENTENMAN (1956). Hierbij worden onder standaardvoorwaarden bekende hoeveelheden aminozuuroplossingen chromatographisch gescheiden, met ninhydrine gekleurd en na elutie in een spectrophotometer gemeten. De gevonden waarden blijken binnen bepaalde grenzen op een rechte lijn te liggen, hetgeen de mogelijkheid biedt om de sterkte van willekeurige met ninhydrine gekleurde vlekken na elutie uit de bijbehorende ijklijn af te lezen.

De ijklijnen werden op de volgende wijze verkregen. Hoeveelheden overeenkomend met 2, 4, 5, 6, 8 en 10 µg van een oplossing welke lysine, glutaminezuur en alanine bevatte, werden op de korte zijde van Whatman No 1 (40 x 30) papier gebracht en chromatographisch gescheiden door tweemaal in dezelfde richting in bovengenoemde oplosmiddelen te ontwikkelen. De looptijd bedroeg beide malen 12 uur. Na drogen werden de chromatogrammen bespoten met 0.5% ninhydrine in 71% alcohol en gedurende 22 minuten verhit bij 65° C. De vlekken werden vervolgens uitgeknipt en geëluëerd in 5 ml. 71% alcohol, door 60 minuten schudden in buizen afgesloten met parafilm. De absorptie werd vervolgens gemeten bij 575 mµ tegen het eluaat van een ongekleurd deel van het chromatogram. De bepaling werd in duplo verricht. Uit het gemiddelde van de duplowaarden werden de functies van de lijnen en de correlatiecoëfficiënten berekend, alsmede de procentuele standaardafwijkingen van het gemiddelde. De hierbij gebruikte formules en de uitkomsten zijn in een aanhangsel weergegeven.

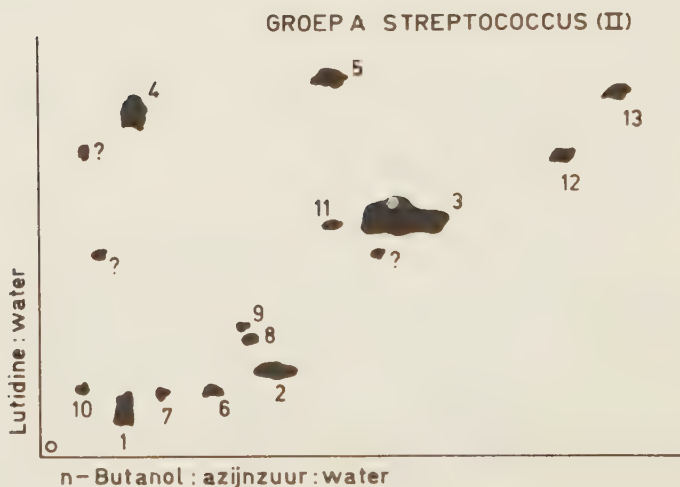
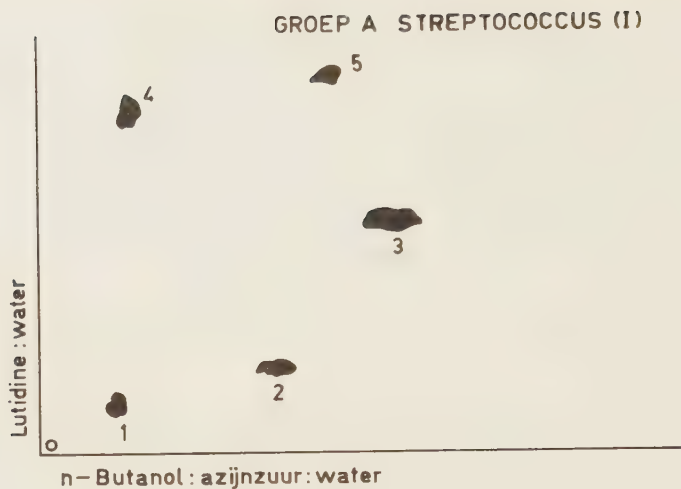
1) Muraminezuur werd voor dit doel welwillend ter beschikking gesteld door Dr. H.R. Perkins, National Institute for Medical Research, Mill Hill, England.

Voor de bepaling van de moleculaire verhouding van de voornaamste aminozuren in de celwand werden de celwandhydrolysaten tweedimensionaal ontwikkeld als voren beschreven. Opgebracht werd 0.006 ml. hydrolysaat. Na drogen werden de chromatogrammen op dezelfde wijze behandeld als bij het vervaardigen van de ijklijnen. De gevonden absorptiewaarden werden voor elk aminozuur afgelezen uit de bijbehorende ijklijn en gedeeld door het moleculairgewicht. Voor het bepalen van de relatieve moleculaire verhouding werd de waarde gevonden voor glutaminezuur op 1 gesteld.

Uitkomsten

Het papierchromatographisch patroon van de aminozuren en aminosuikers voorkomend in de celwandhydrolysaten van de 26 stammen groep A streptococci, is afgebeeld in Fig. 5, I. Alle stammen bevatten alanine, glutaminezuur, lysine, glucosamine en muraminezuur. Toen bleek, dat er behalve deze af en toe nog één of meer zwakke vlekken zichtbaar waren, werd het chromatographisch onderzoek van een aantal stammen herhaald na opbrengen van een drievoudige hoeveelheid materiaal. Daarbij ontstond een patroon als weergegeven in Fig. 5, II. Van een elftal kleinere vlekken konden er acht worden geïdentificeerd als respectievelijk glycine, serine, asparaginezuur, arginine, cysteïne, threonine, valine en isoleucine en/of leucine. De identiteit van de drie andere vlekken kon niet worden vastgesteld. Het aantal bijvlekken was bij de verschillende stammen niet altijd precies gelijk.

Bij de tweede isolering van de celwanden van stam AED (zie afbeelding 1 - 4) bleek dat de cytoplasmaresten tussen de celhulzen slechts ten dele door veelvuldig wassen konden worden verwijderd. Door de behandeling met ribonuclease en trypsine daarentegen werd het materiaal zodanig gezuiverd, dat een nabehandeling met pepsine of met papaïne verder geen invloed had op het elektronenmicroscopische beeld van de celwanden. Het chromatographisch onderzoek, verricht na hydrolyse en opbrengen van voldoende materiaal, gaf voor alle porties hetzelfde beeld als in Fig. 5, II. Kenmerkend voor stam AED was het ontbreken van de arginine vlek, zowel bij de eerste isolering als in alle porties van de tweede isolering. Na het opbrengen van de normale hoeveelheid hydrolysaat werd voor beide stammen groep C streptococci en één stam groep E streptococci eenzelfde patroon gevonden als voor groep A streptococci (Fig. 5, I). Bij beide groep C stammen werd bovendien een galactosaminevlek geïdentificeerd vlak onder glucosamine. Er werd geen onderzoek ingesteld naar het voorkomen van de zogenaamde „bijvlekken" in de chromatogrammen van deze stammen.



Figuur 5, I en II. Schematische weergave van chromatogrammen van celwandmateriaal, gehydrolyseerd in 6 N HCl. Opgebracht werd respectievelijk (I) 0.006 ml. en (II) 0.018 ml. hydrolysaat. De looptijd bedroeg in beide richtingen 20 uur. De kleuring geschiedde met ninhydrine. De interpretatie van de vlekken is de volgende: 1 lysine, 2 glutaminezuur, 3 alanine, 4 glucosamine, 5 muraminezuur, 6 asparaginezuur, 7 arginine, 8 glycine, 9 serine, 10 cysteine, 11 threonine, 12 valine, 13 leucine en/of isoleucine. De met ? gemerkte vlekken konden niet worden geïdentificeerd.

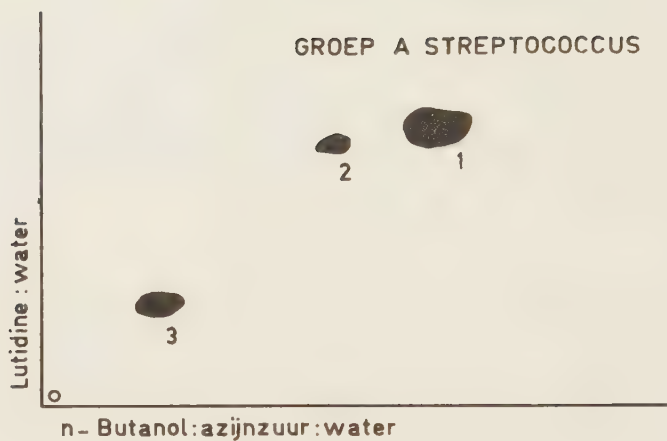
De relatieve moleculaire verhouding waarin lysine, glutaminezuur en alanine in de hydrolysaten van de 29 onderzochte stammen voorkwamen, is weergegeven in Tabel 11. De gemiddelde verhouding bedroeg voor alle stammen groep A streptococci 1.1 : 1 : 4. Het aantal onderzochte stammen groep C streptococci is te klein om gevolgtrekkingen te maken over het relatieve lysinegehalte van hun celwand. Mogelijk is dit gemiddeld iets hogerdan bij groep A streptococci.

Tabel 11

	Stam	Lysine	Glutaminezuur	Alanine
Groep A	type 1	1.1	1	3.8
	" 2	1	1	4
	" 2 T	1.2	1	4.2
	" 3	1.1	1	4
	" 3.13 T	1.1	1	4
	" 4	1.1	1	4.2
	" 5	1.1	1	3.9
	" 5.27 T	1.1	1	4.1
	" 8	1.1	1	3.8
	" 9	1	1	4.2
	" 11	1.1	1	4.3
	" 12	1.2	1	4
	" 12/10	1.1	1	4.1
	" 14	1.1	1	3.8
	" 14 Lowe	1.2	1	4
	" 14/51	1	1	4.1
	" 17	1	1	3.8
	" 23	1.1	1	3.9
	" 24	1	1	4
	" 25	1.1	1	4.1
	" 27	1.1	1	3.9
	" 30	1.1	1	4.1
	AED	1.1	1	3.7
	GL 8	1	1	3.7
	ADA	1.1	1	3.9
	B 6	1	1	3.6
Groep C	anim.	1.2	1	3.8
Groep E	type 2 T	1.2	1	4.2
		1.1	1	4.3

Relatieve moleculaire verhouding van de drie voornaamste aminozuren voorkomend in de celwand van 26 stammen groep A, 2 stammen groep C en één stam groep E streptococci. De waarde gevonden voor glutaminezuur, werd telkens op één gesteld. T achter het typenummer betekent T antigeen dragende stam.

Het papierchromatographisch patroon van de suikers voorkomend in de celwandhydrolysaten van de 26 stammen groep A streptococci, is afgebeeld in Fig. 6. Bij alle stammen werden rhamnose, glucosamine en N-acetylglucosamine gevonden. De hydrolyse van de celwanden, welke in dit geval met 0.5



Figuur 6. Schematische weergave van chromatogrammen van celwandmateriaal, gehydrolyseerd in 0.5 N H_2SO_4 . Opgebracht werd 0.02 ml. hydrolysaat. De looptijd in n-butanol : azijnzuur : water en in lutidine : water bedroeg respectievelijk 20 en 8 uur. De kleuring geschiedde met zuur aniline phtalaat. De interpretatie van de vlekken is de volgende: groep A streptococci : 1 rhamnose, 2 N-acetylglucosamine, 3 glucosamine. Bij groep E streptococci werden bovendien 4 glucose en 5 mannose aangetoond.

N H₂SO₄ in plaats van 6 N HCl werd uitgevoerd, verklaart waarom hier een deel van het glucosamine werd teruggevonden in de vorm waarin het in de celwand voorkomt. Bij de stammen groep C en groep E streptococci (Fig. 6) werden behalve bovengenoemde stoffen ook respectievelijk glucose, en glucose en mannose aangetroffen. Het ontbreken van muraminezuur en galactosamine was vermoedelijk een gevolg van het geringe contrast dat met de kleuring volgens Partridge wordt bereikt.

Discussie

De gegevens welke werden verkregen betreffende het voorkomen van aminozuren, aminosuikers en suikers in de celwanden van 26 stammen groep A streptococci, duiden op een grote mate van stabiliteit in de samenstelling van de celwand binnen een bepaalde bacteriesoort. De samenstelling van de celwand van stam AED was gelijk aan die van de andere stammen, zodat het afwijkend gedrag van deze stam bij de L-inductie onder invloed van D- en L-alanine niet, zoals werd verondersteld, kon worden verklaard uit een afwijkende celwandsamenstelling. Een definitief oordeel over de stabiliteit van de celwandsamenstelling zal pas kunnen worden gegeven, wanneer van een dergelijke reeks ook kwantitatieve gegevens beschikbaar zullen zijn. De hier verkregen semi-kwantitatieve gegevens over de relatieve moleculaire verhoudingen van de voornaamste aminozuren welke in de celwand voorkomen, pleiten eveneens voor een constante samenstelling. Enige reserve dient echter in acht genomen te worden betreffende het regelmatig voorkomen van phosphorhoudende polyolen, welke weliswaar in de celwand van sommige bacteriesoorten zijn aangetoond, doch waarvan niet bekend is of zij ook bij groep A streptococci voorkomen. HAYASHI en BARKULIS (1959) deelden mede, dat de celwand van groep A streptococci voor 53% uit aminozuren, voor 24% uit hexosaminen en voor 22% uit rhamnose bestaat. Wanneer het lage phosphorgehalte van de celwand van deze bacteriesoort, nl. 0.7 - 0.8% (McCARTY, 1952) mede in aanmerking wordt genomen, dan zou er voor teichinezuren weinig ruimte overblijven.

In de literatuur zijn twee mededelingen betreffende een afwijkende samenstelling van de celwand van groep A streptococci. McCARTY en LANCEFIELD (1955) vonden bij enkele zeldzame stammen, welke na muispassage niet meer te groeperen waren, een verschuiving in de verhouding van rhamnose en glucosamine in het groepsspecifieke koolhydraat. Terwijl deze verhouding gewoonlijk 1.5 - 2 bedraagt, werd hiervoor bij de variante stammen

een ratio van 4.8 - 6 gevonden als gevolg van een daling van het hexosamine-gehalte in het C polysaccharide. ROBERTS en STEWART (1961) hebben onlangs een stam beschreven waarvan de celwand behalve rhamnose ook glucose en galactose bevatte, een suikerpatroon dat gewoonlijk gevonden wordt bij groep D en groep E streptococcen. Niettegenstaande de hier vermelde afwijkingen in de samenstelling van de celwand bij enkele stammen, volgt uit het thans verrichte onderzoek dat de voornaamste bestanddelen van het mucopeptide van de celwand van groep A streptococcen, een betrouwbaar kenmerk vormen voor de taxonomische homogeniteit van deze bacteriesoort. De veronderstelling van CUMMINS en HARRIS (1956) dat de bepaling van de samenstelling van de celwand van betekenis zou kunnen zijn voor de taxonomie wordt door het huidige onderzoek bevestigd.

Belangwekkend is het gegeven, dat de hydrolysaten van het op verschillende wijzen gezuiverd celwandmateriaal steeds een kleine hoeveelheid van een betrekkelijk groot aantal aminozuren bleken te bevatten. In tegenstelling met de tot nu toe geldende opvatting vormt deze waarneming een sterke aanwijzing, dat de gezuiverde celwand van Gram-positieve bacteriën een kleine hoeveelheid eiwit bevat. Hiermee in overeenstemming is de mededeling van IKAWA (1961), die in de celwand van drie andere soorten Gram-positieve bacteriën een hoeveelheid eiwit variërend tussen 6.5% en 9%, kon aantonen.

Samenvatting

De hydrolysaten van de celwanden van 26 stammen groep A streptococcen werden papierchromatographisch onderzocht. In alle gevallen vormden lysine, glutaminezuur, alanine, glucosamine, muraminezuur en rhamnose de voornaamste bestanddelen van de celwand van deze bacteriesoort. De gemiddelde relatieve moleculaire verhouding van lysine : glutaminezuur : alanine bedroeg 1.1 : 1 : 4.

Deze uitkomsten geven sterke steun aan de in de literatuur geopperde veronderstelling dat de samenstelling van de celwand binnen een bacteriesoort constant is.

Het op verschillende wijzen gezuiverd celwandmateriaal bevatte, na hydrolyse, steeds een kleine hoeveelheid van een betrekkelijk groot aantal aminozuren. Op grond hiervan is het waarschijnlijk, dat in de celwand van Gram-positieve bacteriën, naast polymeren van peptiden en polysacchariden en van fosforhoudende polyolen, een kleine hoeveelheid eiwit voorkomt.

Hoofdstuk V

ONDERZOEK OVER DE WERKING VAN PENICILLINE EN D-AMINOZUREN BIJ GROEP A STREPTOCOCCEN EN STAPHYLOCOCCEN

Vraagstelling

In Hoofdstuk III werd aangetoond, dat glycine en die D-aminozuren welke niet in de celwand voorkomen, bij groep A streptococcen een potentiërende L-inducerende werking hebben ten opzichte van penicilline. Tevens werd aangetoond, dat behalve penicilline ook D-cycloserine een L-inducerende werking heeft. Het L-inducerend effect van D-cycloserine kon worden versterkt door glycine of D-serine en werd opgeheven door D-alanine. Aan de hand van literatuurgegevens werd besproken hoe het ontstaan van de L-phase onder invloed van penicilline, D-cycloserine en glycine op redelijke wijze kon worden verklaard uit de remmende werking welke deze stoffen zouden hebben op de celwandsynthese. De hypothese werd geformuleerd, dat aminozuren met een L-inducerend effect evenals glycine werkzaam zijn via een remming van de celwandsynthese. De juistheid van deze hypothese zal in dit hoofdstuk worden onderzocht. In aansluiting aan hetgeen hierover in Hoofdstuk III reeds werd medegedeeld, zal de remmende werking van penicilline op de celwandsynthese, voorzover dit van belang is voor een goed begrip van de experimenten, aan een nadere beschouwing worden onderworpen.

Inleiding

De huidige opvatting over de specifieke werking van penicilline bij bacteriën berust op de volgende waarneming van PARK (1952). Deze toonde aan, dat in het koude trichloorazijnzuur (TCA) extract van met penicilline geïncubeerde staphylococcen een veel grotere hoeveelheid van een drietal uridinenucleotiden voorkwam dan in een soortgelijk extract van onbehandelde cellen. Hij concludeerde hieruit, dat penicilline bij staphylococcen een ophoping te weeg bracht van stoffen die onder normale omstandigheden slechts in kleine hoeveelheden bij deze bacteriën voorkomen. PARK (1952) stelde eveneens

vast, dat het grootste uridinenucleotide door middel van diphosphaat aan een N-acetylaminosukerpeptide gebonden was. Het peptide had een kortere keten bij het tweede en ontbrak bij het derde uridinenucleotide. De biochemische betekenis van deze waarnemingen werd duidelijk, nadat de juiste samenstelling van het N-acetylaminosukerpeptide enerzijds (PARK, 1952 en PARK en STROMINGER, 1957) en van de bacteriewand anderzijds, was opgehelderd (SALTON, 1956, CUMMINS en HARRIS, 1956). PARK en STROMINGER (1957) en STROMINGER, PARK en THOMPSON (1959) konden namelijk aantonen, dat zowel in het koude TCA-extract van met penicilline geïncubeerde staphylococceën als in de celwand van deze bacteriën, muraminezuur, L-lysine, D-glutaminezuur en DL-alanine telkens in een verhouding van 1 : 1 : 1 : 3 voorkwamen. In beide gevallen hadden bovendien twee van de drie alanylgroepen de D-configuratie.

Uit de vrijwel identieke samenstelling van bovengenoemde aminosukerpeptiden en van de celwand leidden PARK en STROMINGER (1957) af, dat de door penicilline opgehoopte stoffen in biochemische zin voorlopers zijn van de celwand en dat penicilline door blokkering van een hypothetisch transglycosidase aan het celmembraan, dat de overdracht van het N-acetylmuraminezuurpeptide op de celwand moet bewerken, de normale celwandsynthese in de weg staat. De herhaaldelijk beschreven functie van uridinenucleotiden als de dragers van fragmenten welke dienen voor de synthese van macromoleculen, en de waarneming van COOPER (1956), dat penicilline grotendeels gebonden wordt door de celmembraan van bacteriën, verleenden steun aan de bovengenoemde opvatting. Hiermede zijn tevens in overeenstemming de mededelingen van BROOKES, CRATHORN en HUNTER (1959), welke aantoonde, dat de synthese van celwandpeptiden bij *B. megaterium* aan of vlak onder de celmembraan plaats vindt en VAN MANDELSTAM en ROGERS (1959), welke vaststelden, dat bij staphylococceën gekweekt in aanwezigheid van penicilline, nog korte tijd een kleine hoeveelheid celwandpeptide van abnormale samenstelling wordt gevormd.

Niet in tegenspraak met het voorafgaande, doch wel onverklaard (STROMINGER, 1960) is de wijze waarop glycine in de celwand van staphylococceën wordt ingebouwd. Dit aminozuur vormt namelijk een belangrijk bestanddeel van de celwand van deze bacteriesoort, doch komt niet voor in de celwandvoorlopers gevonden door PARK en STROMINGER (1957). Een mededeling van ITO, ISHIMOTO en SAITO (1958), die bij een andere stam van *Staphylococcus aureus* ook glycine- en asparaginezuurhoudende uridinenucleotideaminosukerpeptiden aantoonde, vormt daardoor een welkome aanvulling voor de kennis van de celwandsynthese.

De celwand van *Staphylococcus aureus* bevat geen hexosen of pentosen, doch bestaat voor 1/3 deel uit aminosuikerpeptiden (HANCOCK, 1960) en voor het overige 2/3 deel vermoedelijk geheel uit teichinezuren. De vraag doet zich dus voor, of de inbouw in de celwand van aminosuikerpeptiden en van een dubbel zo grote hoeveelheid teichinezuren op dezelfde wijze plaats vindt, en zo ja, of penicilline op het laatstgenoemde proces eveneens van invloed is. Beide vragen moeten vermoedelijk bevestigend beantwoord worden, aangezien PARK en STROMINGER (geciteerd door ARMSTRONG, BADDILEY, BUCHANAN en CARSS, 1958) bij *Staphylococcus aureus* een ribitol nucleotide hebben gevonden, dat werd opgehoopt onder invloed van penicilline. In dit geval bestond het nucleotide echter niet uit uridinephosfaat, doch uit cytidinediphosfaat.

De ophoping van celwandvoorlopers bij *Staphylococcus aureus* wordt behalve door penicilline ook veroorzaakt door bacitracine (NEWTON, CRAWFORD en ABRAHAM, 1957), novobiccine (HAHN, 1960), een onzuiverheid in een bepaald monster gentiaanviolet (STROMINGER, 1959), D-cycloserine (CIAK en HAHN, 1959, STROMINGER, THRENN en SCOTT, 1959), glycine en oxytetracycline (PARK, 1958) en door bacteriën te kweken in een lysine-deficiënt medium (STROMINGER en THRENN, 1959). Hetzelfde verschijnsel is ook éénmaal beschreven bij *E. coli* onder invloed van 5-fluorouracil (TOMASZ en BOREK, 1960).

De aard van de opgehoopte voorloper kan wisselen wat betreft de lengte van de daarin voorkomende peptideketen. De voornaamste celwandvoorloper, welke b.v. door penicilline, bacitracine en novobiocine wordt opgehoopt, is het uridinediphosfaat-N-acetylmuraminezuur -lactyl- L-ala-D-glu- L-lys-D-ala-D-alanine. Bij de celwandvoorloper welke wordt opgehoopt door D-cycloserine, ontbreken daarentegen de twee laatste D-alanyl groepen. STROMINGER, THRENN en SCOTT (1959) hebben aangetoond, dat de ophoping van deze celwandvoorloper onder invloed van D-cycloserine kan worden voorkomen of zelfs opgeheven door op het juiste moment D-alanine aan het systeem toe te voegen. Een analyse van de antagonistische werking van beide stoffen wees verder uit, dat deze berustte op een competitieve inhibitie van structuuranalogen. De antagonistische werking van D-cycloserine en D-alanine, welke bij de in Hoofdstuk III beschreven proeven ook van toepassing bleek bij het induceren van L-vormen van groep A streptococci, wordt door deze waarneming nader verklaard.

De volgende technieken zijn toegepast bij de isolering en de kwantitatieve bepaling van de uridinenucleotiden, welke voorkomen in de TCA-extracten van

bacteriën. PARK (1952) verkreeg een goede scheiding van de voornaamste celwandvoorlopers door middel van aethanolfractionering van de extracten. Na erop gewezen te hebben, dat de werkwijze van Park ongeschikt was voor kwantitatieve doeleinden, werkte STROMINGER (1957) voor de bepaling van de totale hoeveelheid celwandvoorlopers een geheel andere methode uit. Hij ging daarbij uit van de omstandigheid, dat de uridinenucleotiden in de extracten van staphylococcen alleen N-acetylmuraminezuur bevatten en dat deze stof door een voorzichtige hydrolyse in zwak zuur milieu in een verhouding van 1 : 1 uit de uridinenucleotiden kon worden vrijgemaakt. Een bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte in dit stadium van de bewerking kwam dus overeen met de bepaling van de totale hoeveelheid celwandvoorlopers in het extract, aangezien hierin verder geen of zeer weinig andere vrije N-acetylaminosukkers bleken voor te komen. Voor de N-acetylaminosukerbepaling ten slotte werd door Strominger de gewijzigde methode van AMINOFF, MORGAN en WATKINS (1952), welke beschreven werd door REISSIG, STROMINGER en LELOIR (1955), gebruikt. Aangezien bij deze bepaling de kleuropbrengst van equivalente hoeveelheden N-acetylglucosamine en N-acetylmuraminezuur gelijk is, kon eerstgenoemde stof gebruikt worden als standaard bij de bepaling van de hoeveelheid celwandvoorlopers.

Met de zo juist besproken techniek bepaalde STROMINGER (1957) de toename van de totale hoeveelheid uridinenucleotiden onder invloed van penicilline bij *Staphylococcus aureus* stam H, *Lactobacillus arabinosus* en *Streptococcus faecalis*. Hij stelde vast, dat penicilline bij de twee eerstgenoemde bacteriesoorten respectievelijk een vijftien- tot dertigvoudige en een viervoudige toename van uridinenucleotiden ten gevolge had. Onverklaarbaar bleef waarom onder dezelfde omstandigheden bij *Streptococcus faecalis* geen ophoping van de celwandvoorlopers plaats vond.

Er bestaan geen mededelingen over de celwandsyntheseremmende werking van penicilline bij groep A streptococcen. Wel zijn bij deze bacteriesoort de natuurlijk voorkomende uridinenucleotiden onderzocht. CIFONELLI en DORFMAN (1957) en DORFMAN en CIFONELLI (1958) vonden in extracten van 5 - 7 uur oude cellen van deze bacteriesoort de volgende uridineverbindingen: uridinediphosphoglucose, uridinediphospho-N-acetylglucosamine, uridinediphosphoglucuronzuur en een stof, welke naar alle waarschijnlijkheid identiek is aan uridinediphosphomuraminezuur. Kwantitatief waren beide laatstgenoemde stoffen verreweg de belangrijkste uridineverbindingen. Deze gegevens verschaften een sterke aanwijzing, dat het uridinediphosfaat-N-acetylmuraminezuur bij de synthese van de celwand van groep A streptococcen dezelfde functie vervult als bij *Staphylococcus aureus*. Het uridinediphosphoglucuron-

zuur werd door de geciteerde auteurs in verband gebracht met de synthese van het hyaluronzuurhoudende kapsel, welke bij sommige stammen groep A streptococcen voorkomt.

Techniek

Stammen. De proeven werden verricht met *Staphylococcus aureus*, stam Oxford, welke in aanwezigheid van penicilline geen penicillinase vormt en met groep A *Streptococcus*, stam AED, GL 8 en D 58, beschreven in Hoofdstuk II.

Kweekmethode. Aangezien de verkregen uitkomsten afhankelijk bleken te zijn van de wijze waarop de bacteriën werden behandeld, zullen de kweekmethoden bij elke proef afzonderlijk worden vermeld. Voor een goed begrip van het volgende zal hier alleen de werkwijze worden beschreven zoals deze in de eerste proef werd toegepast. De hierbij gebruikt techniek komt in grote trekken overeen met die welke door STROMINGER (1957) werd uitgewerkt voor de bepaling van de celwandvoorlopers bij *Staphylococcus aureus* (Stam H).

Vierhonderdvijftig ml. steriele Todd-Hewitt bouillon (Difco) werden beënt met 45 ml. van een 14-uurscultuur van *Staphylococcus aureus* (stam Oxford) in hetzelfde medium en vervolgens geïncubeerd bij 37° C. De bacteriën werden geoogst in de logaritmische phase van de groeicurve bij ongeveer half-maximale groei. Voor deze stam kwam dit overeen met een troebeling van 0.8, gemeten in een spectrophotometer bij een golflengte van 550 mμ (OD⁵⁵⁰ 0.8). De cultuur werd vervolgens gecentrifugeerd in een gekoelde centrifuge bij 3000 toeren per minuut, twee maal gewassen met aqua destillata en gesuspenseerd in enkele ml. aqua destillata. Deze bewerking geschiedde onder steriele omstandigheden.

Een hoeveelheid suspensie overeenkomend met 60 ml. van de cultuur werd geënt in een aantal flesjes, welke elk 20 ml. Todd-Hewitt bouillon bevatten. Twee controleflesjes werden bewaard bij 4° C, de overige, welke tevens een zekere hoeveelheid penicilline, glycine of D-methionine bevatten, werden gedurende 90 minuten geschud bij 37° C. Voor nader te beschrijven doeleinden werd daarna de troebeling van alle culturen na tienvoudige verdunning gemeten bij 650 mμ. Na de meting werden de culturen gecentrifugeerd, tweemaal gewassen met aqua destillata en opnieuw gecentrifugeerd. Het centrifugeren geschiedde gedurende 20 minuten in een gekoelde Spinco L centrifuge bij 20.000 toeren (= 26.5000 x g) per minuut zonder rem.

Extractie. Voor het extraheren van de kleinmoleculaire fractie uit de bacteriën werden de sedimenten van de behandelde en onbehandelde cellen elk in 1.5 ml. ijskoude 10% TCA gesuspenseerd. De suspensies werden vervolgens gedurende 60 minuten geschud bij 4° C en daarna gedurende 30 minuten, wederom zonder gebruik van de rem, gecentrifugeerd bij 35.000 toeren per minuut ($92.000 \times g$). Na kwantitatief afpipetteren van de aldus verkregen extracten werden deze viermaal uitgeschud met even grote volumina aether, teneinde het TCA daaruit te verwijderen, en met NaOH op pH 8 gebracht. Zij werden tenslotte gedroogd over P_2O_5 *in vacuo*, opgelost in 0.3 ml. water en in bevroren toestand bewaard.

Bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte van de extracten. Zoals in de inleiding werd uiteengezet, dient, voorafgaande aan de bepaling van de hoeveelheid N-acetylaminosuiker in de extracten, een lichte hydrolyse op het materiaal te worden toegepast, teneinde het N-acetylmurarinezuur vrij te maken uit de uridinenucleotiden. Hiertoe werd 0.05 ml. extract gedurende 5 minuten in een kokend waterbad verhit met 0.05 ml. 0.25 N HCl. Aansluitend werd de micromodificatie (STROMINGER, 1957) van de N-acetylaminosuikerbepaling volgens REISSIG, STROMINGER en LELLOIR (1955) uitgevoerd. Deze verliep als volgt: 0.1 ml. hydrolysaat werd met 0.1 ml. 0.125 N KOH in 2% kaliumtetraboraat gedurende 7 minuten verhit in een kokend waterbad. Aan het reactiemengsel werd 0.8 ml. azijnzuur en 0.1 ml. 16% p-dimethylaminobenzaldehyde in een mengsel van azijnzuur en 11.6 N HCl (95 : 5) toegevoegd, waarna de vloeistof gedurende 20 minuten op 37° C werd gehouden. De gevormde kleur werd onmiddellijk gemeten in een spectrophotometer bij 550 m μ tegen een onverhit mengsel van extract en reagentia. De concentraties werden afgelezen op een ijklijn van N-acetylglucosamine (Light), die tussen 0.01 en 0.09 mol/0.05 ml. lineair verliep.

Wijze van weergeven van de uitkomsten. Teneinde de vergelijking van de resultaten van de verschillende proeven te vergemakkelijken, werden alle uitkomsten omgerekend in het aantal micromol N-acetylaminosuiker voorkomend in een gehydrolyseerd extract van 1 l. cultuur met een troebeling van 1 gemeten bij 650 m μ ($OD^{650} 1$). De troebelingsmetingen werden steeds verricht na een tienvoudige verdunning van de betreffende culturen, omdat een rechtlijnig verband tussen verdunning en troebeling alleen geldt voor culturen met een troebeling welke kleiner is dan 0.250. Het tijdstip van de meting werd in het voorafgaande reeds vermeld.

Chromatographie. Voor de papierchromatographie van de extracten werd dezelfde techniek toegepast als werd beschreven in het vorige hoofdstuk. Opgebracht werd 0.03 ml. van elk extract. De looptijd bedroeg in beide richtingen 24 uur. De kleuring geschiedde met ninhydrine.

Uitkomsten

In de eerste proef werd de invloed onderzocht van 0.75 en 1 μ g. penicilline en van 0.4 en 0.6 M glycine op de hoeveelheid N-acetylaminosuiker voorkomend bij *Staphylococcus aureus* (stam Oxford). De uitkomsten zijn weergegeven in Tabel 12. Ter vergelijking is in deze tabel tevens de uitkomst weer-

Tabel 12
Invloed van penicilline en glycine op het N-acetylaminosuikergehalte van *Staphylococcus aureus*.¹⁾

	<i>Staphylococcus aureus</i> (stam Oxford)	<i>Staphylococcus aureus</i> (stam H) ²⁾
Controle	1.6	1.1
"	1.6	
Penicilline 0.75 μ g/ml.	10.8	
" 1 μ g/ml.	11.3	35.7
Glycine 0.4 M	0.86	
" 0.6 M	1.1	

1) Het N-acetylaminosuikergehalte van de culturen werd bepaald als aangegeven in de desbetreffende sectie van de techniek, na zwakke hydrolyse van de koude TCA-extracten van culturen met bekend volume. Na incubatie met penicilline en glycine werden de troebelingen van deze en van de twee niet gereïncubeerde controleculturen bepaald. Met behulp van deze gegevens werden de uitkomsten uitgedrukt in micromol. per liter cultuur OD⁶⁵⁰₁.

2) Gegevens ontleend aan STROMINGER (1957).

gegevens van een door STROMINGER (1957) onder dezelfde omstandigheden verrichte proef. STROMINGER vond onder invloed van penicilline een dertigvoudige toename van N-acetylaminosuiker, doch wees erop, dat de toename bij soortgelijke proeven meestal het vijftenvoudige bedroeg. Bij de hier met stam Oxford verrichte proef werd onder invloed van penicilline een circa zevenvoudige toename van N-acetylaminosuiker gevonden. Glycine had geen invloed op het gehalte van deze stof.

In de twee volgende proeven werd onderzocht, welke invloed respectievelijk penicilline (1 en 4 $\mu\text{g/ml.}$) en glycine (0,3 en 0,4 M) hadden op het N-acetylaminosuikergehalte¹⁾ van groep A streptococcen, stam AED. De uitvoering van beide proeven onderscheidde zich van de vorige, doordat behalve de beide controles, welke in de koude werden bewaard, ook twee gelijkwaardige culturen, tezamen met de penicilline- of glycinehoudende culturen gedurende 90 minuten onder schudden werden gereïncubeerd. Metingen van de troebelingen van de verschillende culturen van stam AED voor en na de reïncubatie wezen uit, dat weinig of geen celdeling had plaats gevonden van de bacteriën welke waren geïncubeerd met penicilline of met glycine. Dit was wel het geval bij de beide controles, welke werden gereïncubeerd zonder de toevoeging van stoffen met bacterieremmende werking. Deze controles werden daarom door verdunning teruggebracht tot dezelfde troebeling als voor de incubatie. Voor de bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte werden gelijke volumina van de verdunde en onverdunde culturen gebruikt. De invoering van de aldus behandelde controles geschiedde teneinde na te gaan of het gehalte van de te bepalen stof behalve door het toevoegen van penicilline of glycine aan de culturen ook door de reïncubatie van de tweemaal gewassen bacteriën werd beïnvloed.

De uitkomsten van beide proeven zijn weergegeven in Tabel 13. De gemiddelde waarden van de twee controles in proef I en II bleken op twee wijzen systematisch van elkaar te verschillen. In de eerste plaats was, bij een vergelijking van de controlewaarden gevonden bij elke proef afzonderlijk, het N-acetylaminosuikergehalte van de gereïncubeerde bacteriën beide malen hoger dan van de niet gereïncubeerde bacteriën. Aangezien de laatste op de helft van de logarithmische groeifase werden geoogst en de eerste door een korte reïncubatie na twee wassingen als late lag phase cellen konden worden beschouwd, ontstond het vermoeden, dat het N-acetylaminosuikergehalte bij streptococcen hoger is naarmate de cellen jonger zijn. Dit vermoeden werd nog versterkt, doordat in de tweede plaats, bij een vergelijking van de twee stellen controlewaarden van de in Tabel 13 met I en II aangeduide proeven, de uitkomsten in proef I systematisch hoger waren dan in proef II. Dit verschil kon eveneens worden toegeschreven aan een verschil in ouderdom van de cellen, aangezien de bacteriën welke werden gebruikt voor de uitvoering van proef I ($\text{OD}^{550} 0.275$), op een vroeger tijdstip van de logarithmische fase werden geoogst dan voor de uitvoering van proef II ($\text{OD}^{550} 0.370$).

1) In het volgende zal steeds, tenzij anders vermeld, gesproken worden over het N-acetylaminosuikergehalte van bacteriën, waar in feite het gehalte aan door zwakke hydrolyse vrijgemaakt N-acetylaminosuker van het koude TCA-extract van bacteriën bedoeld is.

Tabel 13

Invloed van de ouderdom van de cultuur en van verschillende concentraties penicilline of glycine op het N-acetylamino-suikergehalte van groep A *Streptococcus* (stam AED)¹⁾

OD ⁵⁵⁰ Aanvang ²⁾	0.275 I	0.370 II
Controle (1) ³⁾	5.1	3.2
" (2)	7.3	4
Penicilline 1 µg/ml.	9.5	
" 4 µg/ml.	11.5	
Glycine 0.3 M		5.5
" 0.4 M		5

1) Uitgedrukt in mol/l OD⁶⁵⁰ 1. Vergelijk onderschrift tabel 12.

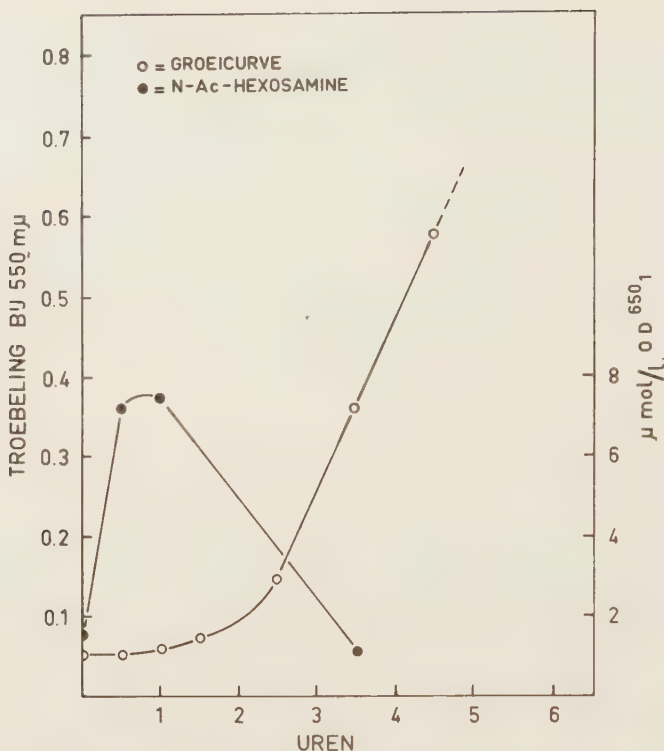
2) Voor de uitvoering van de twee hier weergegeven proeven werd uitgegaan van twee culturen met de aangegeven troebelingen gemeten bij een golflengte van 550 µm. De bacteriën waren bij proef I dus iets jonger dan bij proef II.

3) De uitkomsten van controle 1 en 2 geven de gemiddelde waarden van tweevoudige bepalingen weer. De bacteriën van controle 1 werden niet gereïncubeerd. De bacteriën van controle 2 werden evenals de overige culturen gedurende 90 minuten gereïncubeerd. Aangezien deze culturen voor reïncubatie twee maal in aq. dest. waren gewassen, werden zij geoogst aan het einde van een nieuwe lag phase. De bacteriën van controle 2 waren dus jonger dan van controle 1.

De beoordeling van de invloed die penicilline of glycine op het N-acetylamino-suikergehalte van stam AED uitoefenden, werd bemoeilijkt door het verschil in uitkomsten van de controleculturen van de wel en niet gereïncubeerde bacteriën. Uit de gegevens weergegeven in Tabel 13 is echter zonder meer duidelijk, dat deze invloed in beide gevallen gering was, welke controle ook als maatstaf werd gebruikt.

Teneinde de zo juist geformuleerde hypothese over het verband tussen het natuurlijke N-acetylamino-suikergehalte en de ouderdom van de cultuur te bevestigen en daardoor een verantwoorde behandeling van de controlecultuur mogelijk te maken, werd in een volgende proef het natuurlijke N-acetylamino-suikergehalte van stam AED gedurende de lag en log phase onderzocht. De werkwijze was daarbij als volgt.

Een fles inhoudende 4 l. steriele Tood-Hewitt bouillon met een temperatuur van 37° C, werd beënt met een hoeveelheid suspensie van tweemaal in aqua destillata gewassen streptococcen (stam AED) overeenkomend met 200 ml. 16-uurscultuur en geïncubeerd bij 37° C. De troebeling van deze cultuur werd



Figuur 7. Verandering van het N-acetylaminosukergehalte van groep A *streptococcus*, stam AED, in de lag phase en het eerste deel van de logarithmische phase. Op de aangegeven tijden werden suspensies van twee maal gewassen bacteriën gemaakt en vervolgens door verdunning teruggebracht tot eenzelfde troebeling. Met gelijke volumina van deze suspensies werden enerzijds de N-acetylaminosukerbepalingen en anderzijds tweevoudige drooggewichtsbepalingen verricht. De drooggewichten van de suspensies zijn weergegeven in Tabel 14.

Tabel 14

Drooggewichten van stam AED bacteriën afkomstig van culturen van verschillende ouderdom.

Leeftijd in min.	(1)	(2)	Gemiddeld
0	0.53	0.51	0.52
30	0.50	0.52	0.51
60	0.51	0.50	0.51
210	0.49	0.49	0.49

Culturen van verschillende ouderdom werden geoogst en tweemaal gewassen. Uit de sedimenten werden vervolgens suspensies gemaakt met gelijke troebelingen. Voor het vervaardigen van de suspensie op het uur 0 werd een 16-uurscultuur gebruikt. De drooggewichten werden in tweevoud van 5 ml. volumina van elke suspensie bepaald en omgerekend in mg./ml. Dezelfde suspensies werden gebruikt voor de bepaling van het N-acetylaminosukergehalte van de bacteriën. De uitkomsten van deze bepalingen zijn weergegeven in Fig. 6.

voor de incubatie en verder op de tijden aangegeven in Fig. 7, gemeten bij 550 m μ tegen onbeënte Todd-Hewitt. De eerste meting geschiedde na 30 minuten en was gelijk aan de vorige. Op hetzelfde tijdstip en na 60 en 120 minuten werden respectievelijk 1200, 1100 en 800 ml. cultuur afgezonderd en onmiddellijk in de koude gecentrifugeerd, tweemaal gewassen in aqua destillata en gesuspenderd in enkele ml. aqua destillata. Een deel van de suspensie, welke diende voor de beënting van de cultuur, werd gebruikt voor de bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte van de bacteriën op het uur nul. Van de vier aldus verkregen suspensies werden door verdunning nieuwe suspensies gemaakt, welke alle bij tienvoudige verdunning een OD⁶⁵⁰ 0.1 hadden. Het N-acetylaminosuikergehalte van de bacteriën werd vervolgens op de eerder beschreven wijze bepaald in 20 ml. van elk van deze suspensies. Bovendien werden van elke suspensie twee maal 5 ml. volumina gedroogd tot constant drooggewicht en gewogen. Het drogen geschiedde in een droogstoof bij 105° C en vervolgens boven P₂O₅ *in vacuo* gedurende tenminste 24 uur. Het bepalen van de drooggewichten was noodzakelijk, omdat er geen zekerheid bestond over de geldigheid van een gegeven troebeling als maat voor een constante hoeveelheid celmateriaal afkomstig zowel uit de lag als uit de log phase van de groeicurve. PRICE (1952) heeft namelijk beschreven dat het drooggewicht van *Staphylococcus muscae* gedurende de lag phase door volumevermeerdering met 50% toenam. In Fig. 7 werd de groeicurve van stam AED en het N-acetylaminosuikergehalte van de vier suspensies, uitgedrukt in micromol. per liter suspensie met een troebeling van 1 gemeten bij 650 m μ , weergegeven. Hieruit blijkt, dat bij bacteriën van stam AED in de lag phase een vijfvoudige ophoping plaats vindt van het natuurlijke N-acetylaminosuikergehalte. De duplo uitkomsten van de drooggewichten (Tabel 14) van de suspensies verschilden niet van elkaar. Het gewicht van de afzonderlijke bacteriën steeg dus blijkbaar niet in de lag phase, zodat de troebelingsmetingen van de suspensies als maat voor de hoeveelheid celmateriaal van stam AED inderdaad geldig bleken te zijn. Herhaling van dit experiment met twee andere stammen groep A streptococci (stam GL 8 en D 58) gaven gelijksoortige uitkomsten, zij het dat bij deze stammen in de lag phase een viervoudige in plaats van een vijfvoudige stijging van het N-acetylaminosuikergehalte plaats vond (Tabel 15). Aan het einde van de logarithmische phase bedroeg het gehalte van de onderzochte stof bij deze stammen ongeveer de helft van de uitkomst gevonden in het begin van de log phase.

Vergelijkbare hoeveelheden extracten afkomstig van stam AED bacteriën uit respectievelijk de lag phase en de halflogarithmische phase, werden chromatographisch tweedimensionaal gescheiden. Na kleuring met ninhydrine wer-

Tabel 15

Natuurlijk N-acetylaminosuikergehalte van twee stammen groep A streptococcen tijdens de lag phase en de log phase

Stam D 58			Stam GL 8		
Tijd in min.	OD ⁵⁵⁰	N-Ac. amino suiker	Tijd in min.	OD ⁵⁵⁰	N-Ac. amino suiker
0	0.080	2.2	0	0.045	0.4
20	0.102	6.	30	0.045	4.5
50	0.135	5.2	80	0.052	3.3
80	0.195	3.1	165	0.086	2.2
170	0.531	3.1	330	0.224	1.4
260	0.798	1.8	400	0.275	1.2

De uitvoering van beide proeven was gelijk aan die welke is weergegeven in Fig. 7, met dit verschil, dat bij stam D 58 een 10% enting in plaats van een 5% enting werd gebruikt. Uit de troebelingsmetingen bij 550 m μ blijkt dat hierdoor bij deze cultuur geen echte lag phase ontstond. Het N-acetylaminosuikergehalte van de suspensies werd evenals in de voorafgaande proeven omgerekend in $\mu\text{mol/l. suspensie OD}^{650} 1$.

den op beide chromatogrammen de aminozuren gevonden welke gewoonlijk voorkomen in de vrije aminozuurpool van bacteriën. Onder deze aminozuren was het glutaminezuur het sterkst vertegenwoordigd. Voor twee vlekken bestond een naar schatting viervoudige afname in kleurintensiteit bij vergelijking van de chromatogrammen vervaardigd met materiaal afkomstig van respectievelijk jonge en oude cellen. De localisatie van één van beide vlekken kwam overeen met de loopsnelheid welke door PARK (1952) in dezelfde loopmiddelen werd gevonden voor het grootste N-acetylaminosukerpeptidemolecuul in het koude TCA-extract van *Staphylococcus aureus* (stam H). De natuurlijke ophoping van deze stof in de lag phase werd hier dus opnieuw aangetoond, zij het dat een kleurreactie van NH₂ groepen van de stof met ninhydrine de N-acetylaminosukerbepaling volgens STROMINGER (1957) verving. De localisatie van de tweede vlek kwam overeen met asparaginezuur. Het is redelijk om aan te nemen, dat een kwantitatieve bepaling van het asparaginezuur gehalte van extracten van streptococcen, gemaakt op verschillende tijdstippen van de gehele groeicurve, een soortgelijk beeld zal vertonen als werd gevonden voor het gebonden N-acetylaminosuker in deze extracten, met andere woorden in de lag phase wordt naast N-acetylaminosuker ook asparaginezuur opgehoopt. Een soortgelijke, doch veel zwakkere ophoping werd ook gevonden voor glutaminezuur.

De sterke wisseling van het N-acetylaminosukergehalte in de lag- en in de overgangsphase van de groeicurve was de reden dat bij de volgende proeven over de werking van penicilline en D-aminozuren bij bacteriën de werkwijze van

Strominger werd verlaten. In plaats daarvan werd voor de bepaling van de invloed van penicilline, D-serine of beide, op het N-acetylamino-suikergehalte van *Staphylococcus aureus* (stam Oxford) de methode gevolgd welke werd aangegeven door CIAK en HAHN (1959). Voor deze experimenten werd teruggegrepen op staphylococcen, omdat bij de voorafgaande proeven gebleken was dat penicilline onvoldoende invloed uitoefende op het N-acetylamino-suikergehalte van groep A streptococcen. D-serine werd gebruikt, omdat dit het enige D-aminozuur is dat, zoals in Hoofdstuk III reeds werd vermeld, in betrekkelijk lage concentratie groeiremmend werkt bij staphylococcen.

De uitvoering van de proef was als volgt. Driehonderd ml. steriele Todd-Hewitt bouillon werden beënt met 30 ml. van een 14-uurscultuur van stam Oxford en geïncubeerd bij 37° C tot de cultuur blijkens de troebeling gemeten bij 550 m μ ongeveer éénderde van de logaritmische groeifase bereikt had ($OD^{550} \pm 0.450$). Hoeveelheden van 40 ml. van deze cultuur werden dan snel, zonder tussentijdse wassingen, verdeeld over een aantal flesjes, welke een nader aan te duiden hoeveelheid penicilline, D-serine, of beide, bevatten en onder schudden gedurende 90 minuten gereïncubeerd bij 37° C. Als controle werden twee 40 ml. porties van dezelfde cultuur gebruikt, waarvan er één onder de hierboven beschreven omstandigheden werd gereïncubeerd, terwijl de ander in de koude werd bewaard. Voor de bepaling van de hoeveelheid celmateriaal in elke cultuur werd na de incubatie de troebeling van alle culturen bij tienvoudige verdunning gemeten bij 650 m μ . De bepaling van het N-acetylamino-suikergehalte van de culturen geschiedde op dezelfde wijze als in de voorafgaande proeven.

De uitkomsten van de proeven zijn weergegeven in Tabel 16. Daarin zijn tevens de concentraties aangegeven, waarbij de celwandsyntheseremmende werking van penicilline en D-serine werd onderzocht. De uitkomsten van beide controles van de verschillende proeven bleken opnieuw systematisch te verschillen en wel in die zin, dat thans het N-acetylamino-suikergehalte van de gereïncubeerde bacteriën telkens één tot tweemaal lager was dan van de niet-gereïncubeerde cellen. Ofschoon bij de voorafgaande proeven, welke werden uitgevoerd met de methode van Strominger, de omgekeerde situatie bestond, namelijk dat bij de gereïncubeerde controles systematisch hogere uitkomsten werden verkregen dan bij de niet-gereïncubeerde controles, is het verschil in N-acetylamino-suikergehalte van de twee controles in beide gevallen hoogstwaarschijnlijk toch op dezelfde oorzaak terug te voeren. Daarbij dient in het oog gehouden te worden, dat de reïncubatie bij de eerder genoemde proeven een verjonging van de bacteriën betekende, terwijl deze werkwijze bij de hier

Tabel 16

Invloed van de ouderdom van de cultuur en van verschillende concentraties penicilline en D-glycine op het N-acetylaminosuikergehalte van *Staphylococcus aureus* (stam Oxford)¹⁾

Controle (1) ²⁾	5.5	6.3	6.2
" (2)	3	3.8	2
Penicilline 0.5 µg/ml.			11.6
" 1 µg/ml.	11.2	16.8	13.1
" 2 µg/ml.		15.5	
D-serine 0.1 M	2.4	4.2	
" 0.05 M + penicilline 1 µg/ml.		14.5	
" 0.1 M + " 0.5 µg/ml.			10.3
" 0.1 M + " 1 µg/ml.	19.4		11.3

- 1) De uitkomsten werden uitgedrukt in µmol/l OD⁶⁵⁰ 1. Voor de gegevens welke werden gebruikt bij de omrekening, vergelijk het onderschrift van tabel 12.
- 2) De proeven werden uitgevoerd met culturen welke gegroeid waren tot één-derde van de logaritmische fase (OD⁵⁵⁰ 0.4). Controle (1) werd verricht met de bacteriën van deze cultuur. Controle (2) en de overige bepalingen werden verricht, nadat gelijke volumina van deze cultuur gedurende 90 min. waren gereïncubeerd. Aangezien de bacteriën tussentijds niet werden gewassen, had de reïncubatie een normale veroudering van de bacteriën ten gevolge. De bacteriën van controle (1) waren dus bij elke proef jonger dan van controle (2).

besproken proeven een veroudering van de bacteriën ten gevolge had. Het gehalte van de onderzochte stof verandert blijkbaar bij staphylococcen op dezelfde wijze als werd aangetoond voor streptococcen. De toename van het N-acetylaminosuikergehalte ten opzichte van de controlewaarde van de gereïncubeerde bacteriën door penicilline (1 µg/ml.) was vier- tot zesvoudig. Hier zij vermeld, dat CIAK en HAHN (1959) met *Staphylococcus aureus* (stam H) eveneens een zesvoudige toename van N-acetylaminosuiker vonden onder invloed van 1 µg/ml. penicilline in eenzelfde proefopstelling. Uit Tabel 16 blijkt verder, dat D-serine weinig invloed had op het N-acetylaminosuikergehalte van de hier onderzochte stam. De gecombineerde werking van D-serine en penicilline overtrof éénmaal de werking van penicilline alleen, doch deze waarneming kon niet worden gereproduceerd.

Discussie

Wanneer de uitkomsten van de hier verrichte proeven worden overzien, dan blijkt dat geen argumenten gevonden werden voor de hypothese dat amino-

zuren remmend werken op de celwandsynthese. Ook lukte het niet een versterkte ophoping van celwandvoorlopers aan te tonen als uiting van een potentiërende werking van penicilline en D-serine. Dit neemt niet weg, dat de waarnemingen „in vivo”, welke beschreven werden in Hoofdstuk III, een zodanige werking zeer waarschijnlijk maakten, zodat aangenomen moet worden, dat de bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte niet de juiste maatstaf was voor het aantonen van het verwachte effect.

Voor de bestudering van een eventuele potentiërende werking van penicilline en D-aminozuren was het noodzakelijk ook de ophoping van de celwandvoorloper te bepalen welke plaats vond onder invloed van penicilline alleen. Daarbij bleek in de eerste plaats, dat de ophoping van N-acetylaminosuiker bij staphylococcen onder invloed van penicilline, als uiting van de remmende werking van deze stof op de celwandsynthese, veel geringer was dan door Strominger werd aangegeven. Een verklaring voor dit verschil in uitkomsten zou gezocht kunnen worden in het gebruik van verschillende stammen en voedingsbodems in de onderscheiden proefopstellingen. Nochtans dient erop gewezen te worden, dat Ciak en Hahn, werkend met dezelfde staphylococcestam en voedingsbodem als Strominger, toch een veel kleinere toename vonden van N-acetylaminosuiker onder invloed van penicilline dan laatstgenoemde. Aangezien de uitkomsten van de hier verrichte proeven verder een duidelijke aanwijzing gaven voor het feit dat het natuurlijke N-acetylaminosuikergehalte van staphylococcen evenals bij streptococcen hoger was naarmate de bacteriën jonger waren, en Strominger de bepaling juist bij vrij jonge cellen verrichtte en daarna vergeleek met het natuurlijke gehalte van de stof bij bacteriën uit de halflogaritmische groeifase, is het waarschijnlijk te achten, dat in de door hem onder invloed van penicilline gevonden stijging van N-acetylaminosuiker een natuurlijke stijging van deze stof schuil ging. De uitkomsten van Strominger kunnen dan ook niet zonder voorbehoud worden aanvaard. De zesvoudige toename van celwandvoorlopers onder invloed van penicilline, welke werd gevonden door Ciak en Hahn bij stam H en hier met stam Oxford werd bevestigd, geeft vermoedelijk een juister beeld van het celwandsyntheseremmend vermogen van penicilline, omdat bij deze proefopstelling een cultuur van gelijke ouderdom als controlemaat wordt gebruikt. Toch dient men zich af te vragen of de keuze van een controle van zonder penicilline en ongewassen gereïncubeerde bacteriën wel geheel juist is. Het is namelijk geenszins met zekerheid uit te maken of dergelijke cellen tijdens de reïncubatie in dezelfde mate „verouderen” als de terzelfder tijd met penicilline geïncubeerde bacteriën. In de proefopstelling van Ciak en Hahn weegt dit bezwaar echter niet erg zwaar, daar uit de vergelijking van de twee controles van niet en wel gereïncu-

cubeerde bacteriën bleek, dat het natuurlijke N-acetylaminosuikergehalte bij doorgroei in de log phase slechts matig vermindert.

Enigszins onverwacht was de waarneming dat penicilline niet of nauwelijks aanleiding gaf tot een stijging van het N-acetylaminosuikergehalte bij stam AED. Hieruit moet de belangrijke gevolgtrekking gemaakt worden, dat de celwandsyntheseremmende werking van penicilline bij streptococcen op andere wijze verloopt dan bij staphylococcen. Eenzelfde waarneming, welke door STROMINGER (1957) werd gedaan bij *Streptococcus faecalis*, is blijkens de litteratuur geheel in de schaduw gesteld door de fraaie uitkomsten welke door PARK en STROMINGER (1957) werden verkregen bij *Staphylococcus aureus*. De aanwezigheid van dezelfde celwandvoorlopers zowel bij streptococcen als bij staphylococcen maakt het niet waarschijnlijk dat de werking van penicilline bij eerstgenoemde bacteriesoort uiteindelijk wezenlijk anders, dat wil zeggen niet via een remming van de celwandsynthese, zou verlopen. Toen bleek, dat glycine en in een niet weergegeven proef ook D-methionine in dezelfde proefopstelling bij streptococcen zo mogelijk nog minder werkzaam waren dan penicilline werd het onderzoek in deze richting niet voortgezet.

De sterke ophoping van het natuurlijk voorkomend N-acetylaminosuiker bij groep A streptococcen in de lag phase is niet onbegrijpelijk, waarnevoor ogen gehouden wordt, dat bacteriën in de lag phase tekenen vertonen van een zeer actieve stofwisseling zonder dat nochtans celdeling plaats vindt. Blijkbaar strekt de metabole activiteit van de bacteriën in de lag phase zich ook uit tot de aanmaak van de voorlopers van de celwand. De ophoping van deze stoffen is dan het logische gevolg van het feit dat in deze periode geen verbruik van deze stoffen kan plaats hebben. Uit het verdere verloop van de curve blijkt, dat omgekeerd de celwandvoorlopers tijdens de periode van actieve celdeling sneller worden opgebruikt dan zij worden aangemaakt. Wil deze uitleg van het verloop van het N-acetylaminosuikergehalte van de bacteriën in de verschillende groeifasen geldig zijn, dan moet nog worden voldaan aan het postulaat, dat het N-acetylaminosuiker dat werd gevonden in de verschillende extracten, inderdaad deel uit maakt van de celwandvoorlopers en dus identiek is aan N-acetylmuraminezuur. Ofschoon dit hier niet bewezen werd, zijn er wel enkele aanwijzingen die zulks waarschijnlijk maken. Door weglating van de zwakke hydrolyse van de extracten van de bacteriën, welke voorafgaat aan de N-acetylaminosuikerbepaling werd in deze, zoals trouwens ook in de andere besproken experimenten, de kleurvorming met het Ehrlichse reagens genoeg volledig te niet gedaan. Hieruit blijkt, dat het N-acetylaminosuiker in de extracten bijna uitsluitend in gebonden vorm voorkwam. Steun voor de op-

vatting dat de kleurvorming bij de N-acetylaminosuikerbepalingen veroorzaakt werd door N-acetylmuraminezuur, kan ook worden gevonden in de eerder genoemde mededelingen van CIFONELLI en DORFMAN (1957) en DORFMAN en CIFONELLI (1958), welke aantoonde, dat muraminezuurhoudende uridinenucleotiden de kwantitatief belangrijkste component vormden van de uridinenucleotiden in het koude TCA extract van groep A streptococci. Mocht het N-acetylaminosuikergehalte bij staphylococci eenzelfde afhankelijkheid van de leeftijd van de bacteriën vertonen als bij streptococci – een hypothese waarvan de waarschijnlijkheid in het voorafgaande reeds werd bepleit – dan zou dit betekenen, dat de werking van penicilline bij staphylococci eigenlijk neerkomt op het provoceren van een kunstmatige lag phase. Dit zou dan tevens kunnen betekenen, dat de door Park en Strominger beschreven werking van penicilline in wezen secundair is aan een primaire remmende werking van dit antibioticum op het reproductiemechanisme. Immers een primaire remming van dit mechanisme zou voldoende zijn om een kunstmatige lag en daardoor een ophoping van celwandvoorlopers te bewerkstelligen.

HANCOCK (1958) deelde mede, dat het gehalte van de vrije aminozuren aanwezig in het koude TCA-extract van *Staphylococcus aureus* (stam Duncan) aan het einde van de lag phase ongeveer vijftig procent hoger ligt dan in de log phase. Het is zeer goed voorstelbaar dat deze waarneming in feite berustte op een veel sterkere stijging van slechts één of twee aminozuren, zoals hier werd gevonden bij groep A streptococci. De betekenis van een gelijktijdige ophoping in de lag phase van de celwandvoorloper, in het peptide deel waarvan D-alanine en D-glutaminezuur voorkomen, en van asparaginezuur, is niet zonder meer duidelijk. Wellicht echter is de ophoping van asparaginezuur een verschijnsel dat secundair is aan de ophoping van het uridine deel van het nucleotide, waarvan dit aminozuur de voorloper bij uitstek is. Bij de proeven welke werden beschreven in Hoofdstuk III, kwam het vrij voor de hand liggende feit naar voren, dat de celwandsynthese niet geremd wordt door die D-aminozuren welke kwantitatief sterk in de celwand vertegenwoordigd zijn. Het was echter niet duidelijk waarom ook D-asparaginezuur, dat geen deel uitmaakt van de celwand, niet L-inducerend werkte en zich uiteindelijk dus gedroeg als een celwandaminozuur. In het licht van het hierboven gestelde zou het verband tussen D-asparaginezuur en de celwandsynthese moeten worden gezocht in de functie die dit aminozuur vervult bij de synthese van het uridinemolecuul en niet van het peptide van de celwandvoorloper.

Tenslotte dient vermeld te worden, dat MALMGREN en HEDEN (1947) bij de bepaling van de hoeveelheid ultraviolet licht (275 mμ), als maat voor het

nucleïnezuurgehalte, dat door Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën op verschillende tijdstippen van de onderscheiden groeicurven werd geabsorbeerd, voor het eerst het type curve beschreven, dat hier gevonden werd voor het verloop van het N-acetylaminosukergehalte bij groep A streptococcen. De top van de curve werd door hen steeds gevonden aan het einde van de lag phase. PRICE (1952) heeft later aangetoond dat de door Malmgren en Heden gevonden stijging van ultraviolet absorberend materiaal van bacteriën in de lag phase voornamelijk werd veroorzaakt door een stijging van het ribonucleïnezuurgehalte van de bacteriën. Het desoxyribonucleïnezuurgehalte neemt in deze periode bij bacteriën veel minder toe. Een deel van de stijging van ribonucleïnezuur en ribonucleotiden in de lag phase dient ongetwijfeld te worden toegeschreven aan een gelijktijdige stijging van de uridinenucleotiden van de celwandvoorlopers welke in dezelfde groeiperiode bij bacteriën worden opgehoopt.

Samenvatting

De remmende werking op de celwandsynthese door glycine en enkele D-aminozuren, afzonderlijk of tezamen met penicilline, werd onderzocht bij *Staphylococcus aureus* (stam Oxford) en groep A *Streptococcus* (stam AED). De invloed welke door deze stoffen werd uitgeoefend op het door zwakke hydrolyse uit de celwandvoorlopers verkregen N-acetylaminosukergehalte van de koude trichloorazijnzuurextracten van de bacteriën, werd gebruikt als maat voor de celwandsyntheseremmende werking van de verschillende stoffen.

De remmende werking van penicilline op de celwandsynthese van *Staphylococcus aureus* kon worden bevestigd, doch bleek kwantitatief minder sterk te zijn dan in de litteratuur wordt opgegeven. Opmerkelijk was, dat met behulp van de hier gebruikte techniek bij groep A streptococcen onder invloed van penicilline geen ophoping van celwandvoorlopers kon worden aangetoond. Aangezien bij deze bacteriesoort wel de natuurlijke celwandvoorlopers zijn aangetoond, moet worden aangenomen dat het aangrijpingspunt van penicilline op de celwandsynthese bij groep A streptococcen en bij staphylococcen verschillend is.

Glycine, D-methionine en D-serine hoopten bij staphylococcen geen celwandvoorlopers op. D-serine bleek evenmin in staat in dit opzicht de werking van penicilline te versterken. Bij groep A streptococcen bleken glycine en D-methionine nauwelijks invloed uit te oefenen op het N-acetylaminosukerge-

halte van de bacteriën. Daar bij de proeven welke werden beschreven in Hoofdstuk III, sterke aanwijzingen werden gevonden, dat glycine en sommige D-aminozuren de remmende werking van penicilline op de celwandsynthese versterken, moet aangenomen worden, dat ook hier de bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte niet de juiste maatstaf was voor het aantonen van het verwachte effect.

Bij drie stammen groep A streptococcen werd een spontane vier- tot vijfvoudige stijging gevonden van een gebonden N-acetylaminosuker in de koude trichloorazijnzuurextracten tijdens de lag phase van de onderscheiden stammen. Aangezien dit N-acetylaminosuker zeer waarschijnlijk identiek is aan N-acetylmuraminezuur, moet worden aangenomen, dat bij streptococcen een spontane ophoping van celwandvoorlopers plaats vindt in de lag phase. Aanwijzingen werden gevonden, dat een dergelijke ophoping eveneens plaats vindt bij staphylococcen. De sterke veranderingen van het natuurlijke gehalte aan celwandvoorlopers bij jonge bacteriën heeft de noodzaak aangetoond om het onderzoek naar de celwandsyntheseremmende werking van penicilline en andere antibiotica niet met bacteriën uit de lag phase te verrichten, zoals in het verleden wel is gebeurd.

Voor asparaginezuur werd in de extracten van streptococcen in de lag phase een stijging van dezelfde orde gevonden als voor het gebonden N-acetylaminosuker. Aangezien asparaginezuur een voorloper in biochemische zin is van uridine, zou de stijging van dit aminozuur een gevolg kunnen zijn van de ophoping van het uridinenucleotide in de celwandvoorloper.

In het licht van bovengenoemde waarnemingen werd een herinterpretatie gegeven van de specifieke werking van penicilline.

AANHANGSEL

BEREKENING VAN DE FUNCTIE VAN DE IJKLIJNEN, DE CORRELATIE-COEFFICIENTEN EN DE PROCENTUELE STANDAARDAFWIJKINGEN VAN HET GEMIDDELDE

Uit $y = mx + c$ werd m opgelost volgens de formule

$$m = \frac{\Sigma xy - \frac{(\Sigma x)(\Sigma y)}{N}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}}$$

c volgens

$$c = \frac{(\Sigma x)(\Sigma xy) - (\Sigma y)(\Sigma x^2)}{(\Sigma x)^2 - N(\Sigma x^2)}$$

De correlatiecoëfficiënt r werd opgelost uit

$$r = \frac{\Sigma (\bar{x} - x)(\bar{y} - y)}{\sqrt{\Sigma (\bar{x} - x)^2 \cdot \Sigma (\bar{y} - y)^2}}$$

De functies van de ijklijnen en de correlatiecoëfficiënten konden hiermede worden berekend door voor x en y respectievelijk de μg waarden en de gemiddelden van de duplowaarden van de absorpties te substitueren.

De uitkomsten waren de volgende:

lysine $y = 0.0238 x - 0.006$ en $r = 0.994$

glutaminezuur $y = 0.0227 x - 0.0016$ en $r = 0.996$

alanine $y = 0.0382 x - 0.0033$ en $r = 0.997$

De procentuele standaardafwijkingen van het gemiddelde werden berekend uit de drie series ($N = 6$) duplowaarden van de absorpties volgens

$$\sqrt{\frac{\Sigma (d \%)^2}{2N}}$$

waarbij $d \%$ voor elke duploaflezing het percentage voorstelt dat het verschil in de duplowaarneming bedraagt ten opzichte van het duplogemiddelde.

De uitkomsten waren voor lysine $\pm 5.7\%$, voor glutaminezuur $\pm 5.9\%$ en voor alanine $\pm 3\%$.

SAMENVATTING

Dit proefschrift heeft in de eerste plaats een aantal onderzoeken over de L-phase van groep A streptococci tot onderwerp. In Hoofdstuk I werd aan de hand van literatuurgegevens getracht inzicht te verschaffen in het begrip L-phase of L-vorm van bacteriën. Daarbij kwamen de volgende punten in het bijzonder naar voren. Onder de L-phase van bacteriën wordt een bepaalde groeiwijze van de betreffende bacteriesoort verstaan, welke gekenmerkt is door het ontbreken van een groot deel of zelfs van de gehele celwand. De afwezigheid van de starre celwand heeft tot gevolg, dat de bacteriën microscopisch de typische vorm, eigen aan de soort, verliezen en overgaan in pleiomorphe blaasjes. Door de pleiomorphie zijn L-vormen van verschillende bacteriesoorten niet langer van elkaar te onderscheiden. In tegenstelling tot de andere aberrerende vormen van bacteriën kunnen de blaasjes op een vaste voedingsbodem uitgroeien tot kolonies, welke als zodanig blijvend overentbaar zijn. Een kenmerkend verschil tussen bacteriekolonies en L-kolonies is de sterke dieptegroei van de laatste. L-vormen van bacteriën groeien in het algemeen het gemakkelijkst op agar- en serumhoudende voedingsbodems, welke door toevoegen van zouten of sucrose hypertoon gemaakt zijn.

De overgang van de bacterie in de L-vorm, de zogenaamde L-inductie, is bij enkele bacteriesoorten spontaan waargenomen, doch komt bij voorkeur tot stand in aanwezigheid van een kritische dosis penicilline. Van de andere middelen met een L-inducerende werking zij in verband met het volgende alleen nog de overgang van salmonella's in de L-phase onder invloed van glycine vermeld. Aangezien de L-vormen van bacteriën zonder uitzondering ongevoelig zijn voor hoge concentraties penicilline, wordt hierdoor de mogelijkheid geboden deze op eenvoudige wijze rein te kweken uit een mengcultuur met de bacterievorm. Wordt na een beperkt aantal overentingen van een reincultuur van L-vormen, penicilline uit de voedingsbodem weggelaten, dan keert de bacterievorm meestal terug. De passage in de L-vorm beïnvloedt de eigenschappen van de bacterie in het algemeen niet. Bij langdurige overenting in aanwezigheid van penicilline kan de L-phase, in tegenstelling tot de zojuist besproken labiele vorm overgaan in een stabiele vorm, dat wil zeggen dat de groei in de L-phase behouden blijft, ook indien penicilline uit de voedingsbodem wordt weggelaten.

De overgang van groep A streptococcen in de L-phase kan alleen plaats hebben, wanneer aan een vaste voedingsbodem 3% zout (bij voorkeur NaCl) en 10% serumeiwitten zijn toegevoegd. In Hoofdstuk II werd nagegaan in hoeverre door langdurige overentingen, waarbij het zout, het serum of beide, geleidelijk uit de voedingsbodems werden weggelaten, de L-culturen van een aantal stammen in leven gehouden konden worden. In alle gevallen bleek een verregaande adaptatie aan de normale groeivoorwaarden voor streptococcen mogelijk te zijn, zonder dat nochtans het extra zout en serum geheel uit de voedingsbodem konden worden weggelaten. Eén stam kon gedurende 40 weken worden overgeënt op een voedingsbodem welke wel 3% NaCl, doch geen serum bevatte. Zowel een verlaging van het zout- als van het serumgehalte had een verlies van de dieptegroei van de L-kolonies ten gevolge.

In dit hoofdstuk werd verder aangetoond dat groei van L-vormen van verschillende stammen groep A streptococcen ook kan plaats hebben in een voedingsbodem zonder agar doch met 3% zout en 10% paardeserum. Groei in vloeibaar milieu werd echter alleen verkregen, wanneer de L-culturen tevoren een groot aantal malen waren overgeënt op vaste voedingsbodems van een bepaalde samenstelling.

Glycine had bij groep A streptococcen geen L-inducerende werking. Deze stof bleek echter wel in staat het aantal L-kolonies dat bij een gegeven inoculum ontstond onder invloed van penicilline, twintigvoudig te vermeerderen. Deze waarneming werd in Hoofdstuk III bij een viertal stammen van dezelfde bacteriesoort nader uitgewerkt. Een potentiërende L-inducerende werking ten opzichte van penicilline werd daarbij behalve voor glycine ook gevonden voor de D-isomeren van serine, threonine, methionine en lysine. D-alanine bleek in dit opzicht minder werkzaam, terwijl D-glutaminezuur en D-asparaginezuur in aanwezigheid van penicilline geen L-inducerende werking bleken te bezitten. Het potentiërende L-inducerende effect van sommige D-aminozuren en van penicilline bleek zowel kwalitatief als kwantitatief afhankelijk te zijn van het bacterieremmend vermogen van de betreffende aminozuren. Glycine en de eerstgenoemde aminozuren hadden alle bij een concentratie van 0.1 M een sterke remmende werking op de groei van groep A streptococcen. D-glutaminezuur en D-asparaginezuur hadden bij deze concentratie in het geheel geen en D-alanine een matige bacterieremmende werking.

Dat de hier besproken werking van aminozuren beperkt bleef tot de L-inductie, werd afgeleid uit de minder gunstige werking welke glycine had op de groei van een reïncultuur van L-vormen.

Penicilline was tot nu toe het enige antibioticum met L-inducerende werking. Aangetoond werd, dat bij groep A streptococcen ook D-cycloserine L-inducerend kan werken. D-cycloserine is echter in tegenstelling tot penicilline enigszins toxisch voor L-vormen, dat wil zeggen dat het concentratieverschil tussen L-inductie en groeiremming door deze stof veel kleiner is dan bij penicilline. Een potentiërend L-inducerend effect van aminozuren kon ook ten opzichte van D-cycloserine worden vastgesteld. Met name bleek dit het geval te zijn voor glycine en D-serine. D-alanine daarentegen hief de L-inducerende werking van D-cycloserine volledig op.

De voornaamste aminozuren welke voorkomen in de celwand van groep A streptococcen, zijn D- en L-alanine, D-glutaminezuur en L-lysine. Gewezen werd op het feit dat een potentiërende L-inducerende werking ten opzichte van penicilline en een remmende werking op de bacteriegroei alleen gevonden werden bij die D-aminozuren welke niet in de celwand voorkomen. Terwijl enerzijds voor de hand ligt dat aminozuren als D-alanine en D-glutaminezuur, welke een belangrijk bestanddeel van de celwand van de bacteriën vormen, niet in staat waren deze in de L-vorm over te brengen, kon anderzijds niet worden verklaard waarom ook D-asparaginezuur, dat niet in de celwand van groep A streptococcen heet voor te komen, evenmin L-inducerend en remmend op de bacteriegroei werkte. D-asparaginezuur gedroeg zich dus in dit opzicht als een celwandaminozuur. In Hoofdstuk V werd een nader onderzoek ingesteld naar de wijze waarop D-aminozuren bij bacteriën werkzaam zijn.

Een van de onderzochte stammen vertoonde bij de proeven een enigszins afwijkend gedrag, doordat hierbij zowel D- als L-alanine een sterke potentiërende L-inducernede werking hadden in aanwezigheid van penicilline. In aansluiting aan hetgeen hierboven werd medegedeeld over het verband tussen de L-inducerende en bacterieremmende werking van aminozuren en de samenstelling van de celwand, werd daarom aan de mogelijkheid gedacht dat deze waarneming werd veroorzaakt door een abnormaal aminozuurpatroon van de celwand van deze stam. Daarom werd bij deze en bij 25 andere stammen groep A streptococcen een onderzoek ingesteld naar de belangrijkste thans bekende bestanddelen van de celwand van Gram-positieve bacteriën, namelijk de suikers, aminosuikers en aminozuren (Hoofdstuk IV). Het feit dat deze bestanddelen wel bij enkele stammen van een groot aantal bacteriesoorten zijn onderzocht, doch nooit bij een grote reeks stammen van dezelfde bacteriesoort, was mede de aanleiding tot de wat bredere opzet van dit onderzoek. De celwand van alle stammen welke werden onderzocht, bleek rhamnose, glucosamine, muraminezuur, alanine, lysine en glutaminezuur te bevatten. De ge-

gemiddelde verhouding lysine : glutaminezuur : alanine bij de gehele reeks bedroeg 1.1 : 1 : 4. Bij geen van de stammen werd een afwijking van enige betekenis van dit gemiddelde gevonden. In de hydrolysaten van de celwanden konden, behalve de drie genoemde aminozuren, geregeld ook kleine hoeveelheden van een groot aantal andere aminozuren worden aangetoond. Een verregaande zuivering van het celwandmateriaal had geen invloed op de aanwezigheid van deze aminozuren. Hierdoor werd een sterke aanwijzing verkregen dat in de celwand van groep A streptococci, behalve een mucopeptide, ook een kleine hoeveelheid eiwit voorkomt. De onveranderlijkheid in het voorkomen van de voornaamste bestanddelen van de celwand bij een grote reeks stammen van één bacteriesoort bevestigde de veronderstelling van CUMMINS en HARRIS (1956), dat de bepaling van de samenstelling van de celwand van bacteriën een belangrijk hulpmiddel is bij de taxonomie van bacteriën.

Aan het slot van Hoofdstuk III werd de hypothese geformuleerd, dat de potentiërende L-inducerende werking van glycine of van die D-aminozuren, welke niet in de celwand voorkomen (behalve D-asparaginezuur) en van penicilline berust op een versterking van de celwandsyntheseremmende werking van laatstgenoemde stof. De opvatting dat penicilline een remmende werking heeft op de celwandsynthese steunt op een aantal mededelingen in de literatuur waaruit blijkt, dat onder invloed van dit antibioticum onder andere bij staphylococci een ophoping plaats vindt van celwandvoorlopers, welke normaal slechts in kleine hoeveelheden bij deze bacteriesoort voorkomen. De voornaamste celwandvoorloper welke in het koude trichloorazijnzuur (TCA)-extract van staphylococci en zeer waarschijnlijk ook bij groep A streptococci voorkomt, is een uridinenucleotide-N-acetylaminosukerpeptide.

Aanleiding tot het opstellen van bovengenoemde hypothese nu, was het gegeven, dat bij staphylococci een ophoping van celwandvoorlopers behalve onder invloed van penicilline ook kan plaats hebben onder invloed van andere stoffen, waaronder glycine. De juistheid van deze hypothese werd onderzocht in Hoofdstuk V aan de hand van een aantal proeven bij staphylococci en bij streptococci. Nagegaan werd, welke invloed penicilline en glycine of een D-aminozuur, afzonderlijk of tezamen, hadden op het gehalte aan celwandvoorlopers bij ieder van de genoemde bacteriesoorten. De bepaling van het door zwakke hydrolyse uit de uridinenucleotiden vrijgemaakte N-acetylaminosukergehalte in het koude TCA-extract van de bacteriën, werd gebruikt als maat voor de totale hoeveelheid celwandvoorlopers. De specificiteit van het daarbij vrijgemaakte N-acetylmuraminezuur voor de celwandsynthese en het ontbreken van andere vrije of gebonden N-acetylaminosukers in hoeveelheden van

enige betekenis in de extracten van de onderzochte bacteriesoorten vormde de logische achtergrond van de gevolgde werkwijze.

Met behulp van deze techniek kon de remmende werking van penicilline op de celwandsynthese van *Staphylococcus aureus* worden bevestigd, zij het dat deze werking minder sterk was dan in de literatuur wordt opgegeven. Bij groep A streptococcen kon onder invloed van penicilline geen ophoping van betekenis van celwandvoorlopers worden vastgesteld. Aangezien bij deze bacteriesoort de natuurlijke celwandvoorlopers wel voorkomen, moet worden aangenomen dat het aangrijpingspunt van penicilline op de celwandsynthese bij groep A streptococcen en bij staphylococcen verschillend is. Glycine, D-methionine en D-serine hoopten bij staphylococcen geen celwandvoorlopers op. D-serine bleek evenmin in staat in dit opzicht de werking van penicilline te versterken. Bij groep A streptococcen bleken glycine en D-methionine nauwelijks invloed uit te oefenen op het N-acetylaminosuikergehalte van de bacteriën. Daar bij de proeven welke werden beschreven in Hoofdstuk III, sterke aanwijzingen werden gevonden dat glycine en sommige D-aminozuren de remmende werking van penicilline op de celwandsynthese versterken, moet worden aangenomen, dat ook hier de bepaling van het N-acetylaminosuikergehalte niet de juiste maatstaf was voor het aantonen van het verwachte effect.

Bij drie stammen groep A streptococcen werd een spontane vier- tot vijf-voudige stijging gevonden van een gebonden N-acetylaminosuiker in de koude TCA-extracten tijdens de lag phase van de onderscheiden stammen. Aangezien dit N-acetylaminosuiker zeer waarschijnlijk identiek is aan N-acetylmuraminezuur, moet worden aangenomen, dat bij streptococcen een spontane ophoping van celwandvoorlopers plaats vindt in de lag phase. Aanwijzingen werden gevonden dat een dergelijke ophoping eveneens plaats vindt bij staphylococcen. De sterke veranderingen van het natuurlijke gehalte aan celwandvoorlopers bij jonge bacteriën heeft de noodzaak aangetoond om het onderzoek naar de celwandsyntheseremmende werking van penicilline en andere antibiotica niet met bacteriën uit de lag phase te verrichten, zoals in het verleden wel is gebeurd.

Voor asparaginezuur werd in de extracten van streptococcen in de lag phase een stijging van dezelfde orde gevonden als voor het gebonden N-acetylaminosuiker. Aangezien asparaginezuur een voorloper in biochemische zin is van uridine, zou de stijging van dit aminozuur een gevolg kunnen zijn van de gelijktijdige ophoping van het uridinenucleotide in de celwandvoorloper, in de jonge groeifase.

In het licht van bovengenoemde waarnemingen werd een herinterpretatie gegeven van de specifieke werking van penicilline. Gewezen werd op de stijging van het gehalte aan celwandvoorlopers onder invloed van de lag phase enerzijds en van penicilline anderzijds. Hieruit werd geconcludeerd, dat de werking van penicilline bij bacteriën in zekere zin gelijk staat met het wekken van een kunstmatige lag phase door deze stof en dat de remmende werking op de celwandsynthese dus een secundair verschijnsel zou kunnen zijn, volgend op een primaire werking van het antibioticum op het reproductiemechanisme van de bacteriën.

SUMMARY

This thesis deals mainly with experiments on the L-phase of streptococci. Chapter I summarizes the attempts which have been made to provide a satisfactory definition of the term L-phase or L-form of bacteria. From this review the following facts emerge as the most relevant. The growth of bacteria in the L-phase results in the partial or complete absence of the cell wall. The absence of the rigid cell wall makes it possible to see microscopically that the shape which characterizes different bacterial species is lost and is replaced by the outline of pleiomorphic vesicles. Consequently, the pleiomorphic L-forms of the various bacterial species cannot be distinguished from each other. Unlike other aberrant forms of bacteria, these vesicles will grow out on a solid medium into colonies, and as such can be sub-cultured indefinitely. A distinctive phenomenon of L-colonies compared with ordinary bacterial colonies is the former's pronounced growth into the agar. L-forms of bacteria grow preferably on serum containing solid media which are rendered hypertonic by the addition of salts or sucrose.

The natural occurrence in some bacterial species of a transition to L-forms, the so-called L-induction, has been seen only rarely, but a critical dose of penicillin seems to stimulate this process specifically. In view of the discussion which follows, mention is made here of one other substance with L-inducing properties, namely glycine, of which the L-inducing capacity has been reported in salmonella's. Without exception L-forms of bacteria are resistant to high concentrations of penicillin, which makes it possible to obtain pure cultures of these structures easily. When penicillin is omitted from the medium, after a few subcultures of a pure culture of L-forms the reversion to the bacterial form is usually observed. In general the passage through the L-phase does not influence the properties of the bacteria. In contrast to this labile L-phase, frequent subcultures of these structures in the presence of penicillin can give rise to stable L-forms. These no longer revert to bacteria when penicillin is omitted from the medium.

The transition of group A streptococci in the L-phase can take place only in the presence of 3% salt (preferably NaCl) and 10% serum protein. Chapter

II deals with the extent to which the additional salt and serum, separately or combined, could gradually be omitted from the medium in frequent subcultures without affecting the viability of L-cultures. It was found that with all strains considerable adaptation to the usual growth conditions for streptococci was obtained, but that the complete omission of the additional salt and serum was not tolerated. One strain was subcultured weekly for forty weeks on a medium which contained 3% NaCl but no serum protein at all. A reduction in either salt or serum content resulted in a loss of growth into the agar of the L-colonies. Growth of L-forms of various strains of group A streptococci can also be obtained in a medium with 3% salt and 10% horse serum with omission of agar. Growth in a liquid medium, was, however, exclusively obtained when L-cultures had been grown several times on a solid medium of a certain composition before the omission of the agar.

Glycine had no L-inducing effect in group A streptococci. It was found, however, that the number of L-colonies induced by penicillin from a given inoculum increased twentyfold if this amino acid was added to the medium. As described in Chapter III, this observation was further investigated with four strains of the same bacterial species. It was found that a potentiating L-inducing action in the presence of penicillin was also exhibited by the D-isomers of serine, threonine, methionine, and lysine. D-alanine was found to be less effective in this respect, while D-glutamic acid and D-aspartic acid were completely ineffective. The potentiating L-inducing effect of some D-amino acids in combination with penicillin, appeared to be dependent, qualitatively and quantitatively, upon the capacity of these amino acids to inhibit bacterial growth. Glycine and the D-isomers of serine, threonine, methionine, and lysine all had a strong growth inhibiting effect on group A streptococci in a concentration of 0.1 M, while in this same concentration D-alanine exerted a moderate effect and D-glutamic acid and D-aspartic acid exerted no effect at all. That this action of certain amino acids was really limited to their effect on L-induction was concluded from the fact that glycine had an unfavourable effect on the growth of pure cultures of L-forms.

Hitherto, penicillin was the only antibiotic known to have an L-inducing effect. The present investigation demonstrated that D-cycloserine also has a L-inducing effect on group A streptococci. In contrast to penicillin, D-cycloserine is somewhat toxic to L-forms. This follows from the fact that the range of concentrations between L-induction and inhibition of pure L-cultures was much smaller with this substance than with penicillin. A potentiating L-

inducing effect was also found in some amino acids combined with D-cycloserine. This was notably the case with glycine and D-serine. On the other hand, D-alanine completely abolished the L-inducing action of D-cycloserine.

The principal amino acids which occur in the cell wall of group A streptococci are D- and L-alanine, D-glutamic acid, and L-lysine. Attention is drawn to the fact that the potentiating L-inducing effect towards penicillin and the inhibition of bacterial growth were found only with those amino acids which do not occur in the cell wall. While it is understandable that amino acids like D-alanine and D-glutamic acid, which constitute an important part of the cell wall of bacteria, will not induce L-forms, it is less easy to explain why D-aspartic acid, which is almost entirely absent from the bacterial cell wall of group A streptococci has neither an L-inducing nor any growth inhibiting effect. Consequently, D-aspartic acid behaved in this respect as a cell-wall amino acid. The specific action of D-amino acids in bacteria is further discussed in Chapter V.

One of the strains investigated behaved somewhat differently since in this case D- and L-alanine showed a strong potentiating L-inducing effect in the presence of penicillin. In connection with the results mentioned above concerning the relationship between the L-inducing and growth inhibiting effect of amino acids and the composition of the cell wall, the possibility was considered that this divergent behaviour was caused by an abnormal amino acid pattern of the cell wall of this particular strain. Therefore, this strain and twenty-five others strains of group A streptococci were analysed for the three best-known components of the cell wall of Gram-positive bacteria, namely the sugars, amino sugars, and amino acids (Chapter IV). Because these components have been examined in a few strains of a great number of bacterial species but never in a large series of one particular species such an analysis was considered to be essential for this investigation. The cell wall of all the strains which were examined contained rhamnose, glucosamine, muramic acid, alanine, lysine, and glutamic acid. The mean proportion of lysine: glutamic acid : alanine in the whole series was 1.1 : 1 : 4. None of the strains showed a significant deviation from these mean values. In addition to these three amino acids, the hydrolysates of the cell walls also consistently showed minute fractions of many other amino acids. Extensive purification of the cell wall material had no influence on the presence of these various amino acids. This finding strongly indicates that the cell wall of group A streptococci contains, in addition to a mucopeptide, a small amount of protein. The invariability with which the principal amino acids of the cell wall occur in a large

series of strains of one particular bacterial species confirms the view of CUMMINS and HARRIS (1956) that a determination of the cell walls of bacteria constitutes an important aid to the taxonomy of bacteria.

At the end of Chapter III the hypothesis is formulated that the additive L-inducing effect of glycine or those D-amino acids which do not occur in the cell wall (except D-aspartic acid) and of penicillin is the consequence of an enhancement of the cell wall synthesis inhibiting action of penicillin. The view that penicillin has an inhibiting action on cell wall synthesis is supported by a number of reports in the literature that this antibiotic causes, for example with staphylococci, the accumulation of cell wall precursors, which are otherwise only found naturally in small amounts in this species. The principal cell wall precursors occurring in the cold trichloroacetic acid (TCA) extract of staphylococci, and very probably also in group A streptococci, is a uridine-N-acetylaminosugarpeptide.

The logical basis for this hypothesis was found in the fact that the accumulation of cell wall precursors in staphylococci has not only been observed with penicillin but also with other substances including glycine.

The correctness of this hypothesis is examined in Chapter V which describes a number of experiments with streptococci and staphylococci. In these experiments the influence of penicillin and of glycine or certain D-amino acids, separately or combined, on the cell wall precursor content was investigated. The estimation of the N-acetylaminosugar content liberated by mild hydrolysis from the uridinenucleotides present in the cold TCA extracts of the bacteria was used as a measure of the total amount of cell wall precursors. The specificity for cell wall synthesis of the N-acetylmuramic acid freed in this way and the absence of significant amounts of other free or bound N-acetyl amino sugars in the extracts of the bacteria examined constituted the rationale of the method used.

By means of this technique the cell wall synthesis inhibiting effect of penicillin in *Staphylococcus aureus* could be confirmed, but quantitatively this action was found to be weaker than has been reported in the literature. With group A streptococci, however, no accumulation of any importance of cell wall precursors by penicillin could be demonstrated. Since the natural precursors do occur in this bacterial species, it must be assumed that the specific action of penicillin on cell wall synthesis in group A streptococci differs from that in staphylococci.

Glycine, D-methionine, and D-serine did not accumulate cell wall precursors in staphylococci, nor did D-serine enhance the action of penicillin in this respect. Furthermore, with group A streptococci it was found that glycine and D-methionine had hardly any influence on the N-acetylaminosugar content of the bacteria. In the experiments described in Chapter III, strong indications were found that glycine and some D-amino acids enhance the inhibiting action of penicillin on the cell wall synthesis. Therefore, it must be assumed that here again the estimation of the N-acetylaminosugar content was not the correct standard for the demonstration of this effect.

With three strains of group A streptococci a spontaneous fourfold to fivefold increase of bound N-acetylaminosugar was found in the cold TCA extracts of the bacteria during the lag phase of the growth of the different strains. While this N-acetylaminosugar is probably identical with N-acetylmuramic acid, it can be assumed that with streptococci a spontaneous accumulation of cell wall precursors occurs in the lag phase. Reasons are given indicating that such an accumulation also takes place in staphylococci. The important alterations found in the natural content of cell wall precursors shows the importance of not investigating the inhibiting action on cell wall synthesis by penicillin and other antibiotics with lag phase bacteria as has been reported in the past.

The aspartic acid present in the extracts of streptococci showed an increase in the lag phase similar to that of the bound N-acetylaminosugar content. While aspartic acid is a precursor in the biochemical sense of uridine, the increase of this amino acid might be explained as a consequence of the simultaneous accumulation of the uridine nucleotide of the cell wall in the early growth phase.

These observations provide grounds for revision of the current interpretation of the specific action of penicillin. Attention is drawn to the similar increase in cell wall precursor content observed with bacteria in the lag phase and under the influence of penicillin. From this it is concluded that the action of penicillin on bacteria is in a certain sense equal, to the induction of an artificial lag phase by this substance. Therefore, the inhibiting action of penicillin on cell wall synthesis might well be seen as a secondary phenomenon following upon a primary action of the antibiotic on the reproduction mechanism of bacteria.

LITTERATUUR

Overzichten L-vormen

- Dienes, L. en Weinberger, H.J. (1951) *Bact. Rev.* 15, 245 - 288.
 Kandler, O. en Kandler, G. (1960) *Ergebn. Mikrobiol.* 33, 97 - 127.
 Klieneberger-Nobel, E. (1960) in: „The Bacteria” Vol. I ed. I. C. Gunsalus en R. Y. Stanier
 Acad. Press, New York and London, 361 - 386.
 Tulasne, R. (1951) *Rev. Immunol.* 15, 223 - 251.
 Tulasne, R. (1955) *Biol. Med.*, Paris, 44, 391 - 425.

Overzichten celwanden van bacteriën

- Cummins, C.S. (1956) in: „International Review of Cytology” ed. G.H. Bourne en J. F. Danielli, Acad. Press Inc., New York, 25 - 50.
 Salton, M.R.J. (1956) in: „Bacterial Anatomy” Symp. Soc. gen. Microbiol. 6, 81 - 110.
 Salton, M.R.J. (1960a) in: „The Bacteria” Vol. I, ed. I. C. Gunsalus en R. Y. Stanier, Acad. Press, New York and London, 97 - 151.
 Work, E. (1957) *Nature* 179, 841 - 847.
 Zilliken, F. (1959) *Fed. Proc.* 18, 966 - 973.
- Abrams, R.Y. (1955) *J. Bact.* 70, 251.
 Albertsson, P. (1958) *Biochim. biophys. Acta* 27, 378 - 395.
 Alexander-Jackson, E. (1945) *Am. N.Y. Acad. Sc.* 46, 127 - 152.
 Altenbern, R.A. en Landman, O.E. (1960) *J. Bact.* 79, 510 - 518.
 Aminoff, D., Morgan, W.T.J. en Watkins, W.M. (1952) *Biochem. J.* 51, 379 - 389.
 Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G. en Carss, B. (1958) *Nature* 181, 1692 - 1693.
 Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V. en Neuhaus, F.C. (1959) *Nature* 184, 247 - 248.
 Baddiley, J., Buchanan, J.G. en Carss, B. (1958) *Biochim. biophys. Acta* 27, 220.
 Baddiley, J. en Davison, A.L. (1961) *J. gen. Microbiol.* 24, 295 - 299.
 Barkulis, S.S. en Jones, M.F. (1957) *J. Bact.* 74, 207 - 216.
 Bauman, N. en Davis, B.D. (1957) *Science* 126, 170.
 Bonifas, V. (1954) *Schweiz. Z. Allg. Path. u. Bakt.* 17, 525 - 535.
 Brenner, S., Dark, F.A., Gerhardt, P., Jeynes, M.H., Kandler, O., Kellenberger, E., Klieneberger-Nobel, E., McQuillen, K., Rubio-Huertos, M., Salton, M.R.J., Strange, S.E., Tomesik, J. en Weibull, C. (1958) *Nature* 181, 1713 - 1715.
 Brookes, P., Crathorn, A.R. en Hunter, G.D. (1959) *Biochem. J.* 73, 396 - 401.
 Chain, E.B. (1959) *Proc. IVth Int. Congr. Biochem.*, ed. W. Auerswald, Pergamon Press, London, XIV, 170 - 190.
 Ciak, J.G. en Hahn, F.E. (1959) *Antibiot. and Chemother.* 9, 47 - 54.
 Cifonelli, J.A. en Dorfman, A. (1957) *J. Biol. Chem.* 228, 547 - 557.
 Cooper, P.D. (1956) *Bact. Rev.* 20, 28 - 48.
 Cummins, C.S. (1954) *Brit. J. exp. Path.* 35, 166 - 180.
 Cummins, C.S. en Harris, H. (1956) *J. gen. Microbiol.* 14, 583 - 600.
 Dawson, I.M. (1949) in: „The nature of the bacterial surface” Symp. Soc. gen. Microbiol. 1, 119.
 Dienes, L. (1939a) *J. inf. Dis.* 65, 24 - 42.
 Dienes, L. (1939b) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 42, 636 - 640.
 Dienes, L. (1946) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 63, 265 - 270.

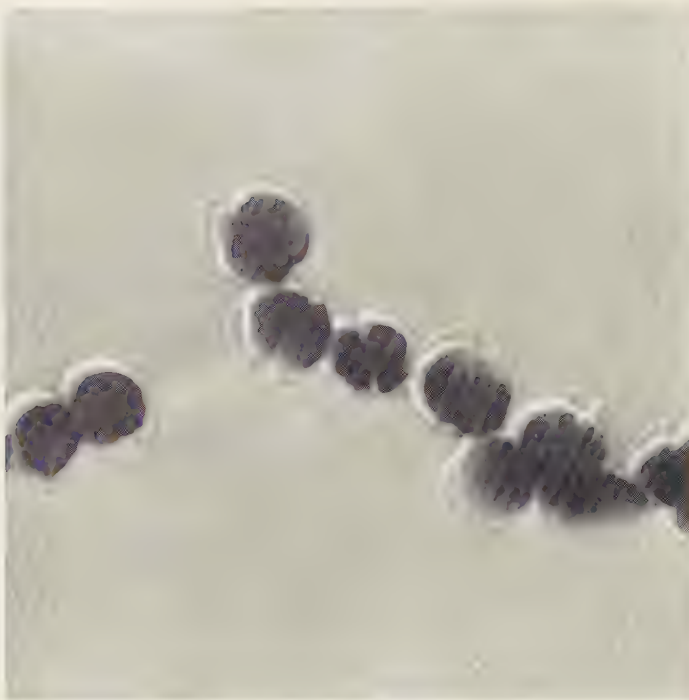
- Dienes, L., Weinberger, H. J. en Madoff, S. (1950) *J. Bact.* 59, 755 - 764.
- Dienes, L. en Zamecknik, P. C. (1952) *J. Bact.* 64, 770 - 771.
- Dienes, L. (1953a) *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 83, 579 - 583.
- Dienes, L. (1953b) *J. Bact.* 66, 280 - 286.
- Dienes, L. en Sharp, J. T. (1956) *J. Bact.* 71, 208 - 213.
- Dolman, C. E. en Chang, H. (1951) *Can. J. Public Health* 42, 73.
- Dorfman, A. en Cifonelli, J. A. (1958) in: „Chemistry and Biology of mucopolysaccharides", Ciba Foundation Symp., ed. G. E. W. Wolstenholm en M. O'Connor, 64 - 84.
- Dubos, R. J. (1958) „Bacterial and Mycotic Infections of Man", J. B. Lippincott Co.
- Edward, D. G. H. (1953) *J. gen. Microbiol.* 8, 256 - 262.
- Edward, D. G. H. (1954) *J. gen. Microbiol.* 10, 27 - 64.
- Edward, D. G. H. (1956) *J. gen. Microbiol.* 14, 197 - 207.
- Elliott, S. D. (1959) *Nature* 184, 1342.
- Elliott, S. D. (1960) *J. exp. Med.* 111, 621 - 630.
- Falkow, S. (1957) *J. Bact.* 73, 443 - 444.
- Fling, M. en Fox, S. W. (1945) *J. Biol. Chem.* 160, 329 - 336.
- Fortner, J. (1928) *Zbl. Bakt. I (Abt. Orig.)* 108, 155 - 159.
- Freimer, E. H., Krause, R. M. en McCarty, M. (1959) *J. exp. Med.* 110, 853 - 874.
- Freundt, E. A. (1956) *Acta path. microbiol. scand.* 38, 246 - 258.
- Fuller, A. T. (1938) *Brit. J. exp. Path.* 19, 130 - 139.
- Gale, E. F. (1951) „Symposium sur le mode d'action des antibiotiques", Sedes, éd. Paris.
- Ghuysen, J. M. (1960) *Biochim. biophys. Acta* 40, 473 - 480.
- Ghuysen, J. M. en Salton, M. R. J. (1960) *Biochim. biophys. Acta* 40, 462 - 472.
- Gilmore, E. en Burnett, G. W. (1959) *J. Bact.* 77, 147 - 155.
- Gooder, H. en Maxted, W. R. (1958) *Nature* 182, 808 - 809.
- Gooder, H. en Maxted, W. R. (1960) *J. gen. Microbiol.* 23, II.
- Gooder, H. en Maxted, W. R. (1961) „Microbial reaction to environment", Symp. Soc. gen. Microbiol., 11, 151 - 173.
- Gordon, J. en Gordon, M. (1943) *J. Path. Bact.* 55, 63 - 68.
- Gordon, J., Hall, R. A. en Stickland, L. H. (1949) *J. Path. Bact.* 61, 581 - 585.
- Gordon, J., Hall, R. A. en Stickland, L. H. (1953) *J. Hyg.* 51, 215 - 224.
- Gordon, J., Hall, R. A. en Stickland, L. H. (1954) *J. Hyg.* 52, 510 - 515.
- Gregorio, P. de, Terranova, T. en Guercio, V. (1957) *G. Mal. infett. parassit.* 9, 1 - 8.
- Hahn, F. E. (1960) geciteerd door McQuillen in: „Polysaccharides in Biology", Transactions 5th Conference, ed. G. F. Springer, Josiah Macy Foundation, 103.
- Hancock, R. (1958) *Biochim. biophys. Acta* 28, 402 - 412.
- Hancock, R. (1960) *Biochim. biophys. Acta* 37, 42 - 46.
- Hayashi, J. A. en Barkulis, S. S. (1959) *J. Bact.* 77, 177 - 184.
- Hijmans, W. en Kastelein, M. J. W. (1960) *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 79, 371 - 373.
- Hotchkiss, R. D. (1950) *J. exp. Med.* 91, 351 - 364.
- Huysmans-Evers, A. G. M. (1955) „Over het voorkomen van pleuropneumonie-achtige lichamen bij de mens", Diss. Amsterdam.
- Ikawa, M. en Snell, E. E. (1956) *Biochim. biophys. Acta* 19, 576 - 578.
- Ikawa, M. en Snell, E. E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1376 - 1381.
- Ikawa, M. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1087 - 1092.
- Itersen, W. van en Ruys, Ch. (1960) *Ant. v. Leeuwenh.* 26, 9 - 22.
- Itersen, W. van en Ruys, Ch. (1960) *J. Ultrastructure Research*, 3, 282 - 301.
- Ito, E., Ishimoto, N. en Saito, M. (1958) *Nature* 181, 906 - 907.
- Ivanovics, G. en Bruckner, V. (1937) *Z. Immun. Forsch.* 90, 304 - 318.
- Joiris, E. (1958) in: *Abstr. VII. Intern Congress for Microbiol.*, 422.
- Jones, D. en Shattock, P. M. F. (1960) *J. gen. Microbiol.* 23, 335 - 343.
- Kandler, G. en Kandler, O. (1955) *Zbl. Bakt. II* 108, 383 - 397.
- Kandler, O. en Kandler, G. (1956) *Z. Naturforsch.* 11 b, 252 - 259.
- Kandler, O., Zehender, C. en Müller, J. (1956) *Arch. Mikrobiol.* 24, 219 - 249.
- Kandler, O. en Zehender, C. (1957) *Z. Naturforsch.* 12 b, 725 - 728.
- Kandler, O., Hund, A. en Zehender, C. (1958) *Arch. Mikrobiol.* 30, 355 - 362.
- Kawatomari, T. (1958) *J. Bact.* 76, 227 - 232.
- Kay, R. E., Harris, D. C. en Entenman, C. (1956) *Arch. Biochem. biophys.* 63, 14 - 25.
- Kent, L. H. (1957) *Biochem. J.* 67, 5P.

- King, H.K. en Alexander, H. (1948) *J. gen. Microbiol.* 2, 315 - 324.
- Klieneberger, E. (1935) *J. Path. Bact.* 11, 93 - 105.
- Klieneberger-Nobel, E. (1956) *Zbl. Bakt. I (Abt. Orig.)* 165, 329 - 343.
- Klieneberger, E. (1958) *J. Hyg.* 38, 458 - 476.
- Lancefield, R.C. (1933) *J. exp. Med.* 57, 571 - 595.
- Lancefield, R.C. (1943) *J. exp. Med.* 78, 465 - 476.
- Landman, O.E., Altenbern, R.A. en Ginoza, H.S. (1958) *J. Bact.* 75, 567 - 576.
- Lark, C. en Lark, K.G. (1959) *Can. J. Microbiol.* 5, 369 - 379.
- Lederberg, J. en St. Clair, J. (1958) *J. Bact.* 75, 143 - 160.
- Lorkiewicz, Z. (1957) *Acta Microbiol. Pol.* 6, 3 - 8.
- Maculla, E.S. en Cowles, P.B. (1948) *Science* 107, 376 - 377.
- Madoff, S. en Dienes, L. (1958) *J. Bact.* 76, 245 - 250.
- Malmgren, B. en Heden, C.G. (1947) *Acta path. microbiol. scand.* 24, 417 - 504.
- Mandel, P. en Terranova, T. (1956) *C.R. Acad. Sc. (Paris)* 242, 1082 - 1084.
- Mandelstam, J. en Rogers, H.J. (1959) *Biochem. J.* 72, 654 - 662.
- Mattman, L.H. en Starnes, R.W. (1959) *Yale J. Biol. Med.* 31, 294 - 302.
- Mattman, L.H., Tunstall, L.H., Mathews, W.W. en Gordon, D.L. (1960) *Am. Rev. Resp. Dis.* 82, 202 - 211.
- Maxted, W.R. (1948) *Lancet II*, 254 - 256.
- McCarty, M. (1952) *J. exp. Med.* 96, 555 - 568.
- McCarty, M. en Lancefield, R.C. (1955) *J. exp. Med.* 102, 11 - 28.
- McQuillen, K. (1960) in: „The Bacteria” Vol. I, ed. I. C. Gunsalus en R. Y. Stanier, Acad. Press, New York en London, 349 - 359.
- Medill, M.A. en O’Kane, D.J. (1954) *J. Bact.* 68, 530 - 533.
- Medill-Brown, M. en Hutchinson, W.G. (1958) *J. Bact.* 74, 280 - 285.
- Mickel, H. (1948) *J. R. Micr. Soc.* 68, 10 - 12.
- Michel, M.F. en Hijmans, W. (1960) *J. gen. Microbiol.* 23, 35 - 46.
- Nelles, A. (1956) *Zbl. Bakt. I*, 164, 78 - 79.
- Newton, G.G.F., Crawford, K. en Abraham, E.P. (1958) in: „Biochemistry of some peptide and steroid antibiotics”, ed. E.P. Abraham, John Wiley and Sons, Inc. New York, 81.
- Paine, C.M. en Heinz, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1080 - 1085.
- Panos, Ch. en Barkulis, S.S. (1959) *J. Bact.* 78, 247 - 252.
- Panos, Ch., Barkulis, S.S. en Hayashi, J.A. (1959) *J. Bact.* 78, 863 - 867.
- Park, J.T. (1952) *J. Biol. Chem.* 194, 877 - 884, 885 - 895, 897 - 904.
- Park, J.T. en Strominger, J.L. (1957) *Science* 125, 99 - 101.
- Park, J.T. (1958) *Biochem. J.* 70, 2P.
- Park, J.T. en Hancock, R. (1960) *J. gen. Microbiol.* 22, 249 - 258.
- Partridge, S.M. (1949) *Nature* 164, 443.
- Pierce, C.H. (1942) *J. Bact.* 43, 780 (Abstr.).
- Price, W.H. (1952) *J. gen. Physiol.* 35, 741 - 759.
- Prozorovskii, S.W. (1959) *J. microbiol. epidemiol. immunobiol.* 30, 117 - 121.
- Razin, S. en Oliver, O. (1961) *J. gen. Microbiol.* 24, 225 - 237.
- Reissig, J.L., Strominger, J.L. en Leloire, L.F. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 959 - 966.
- Roberson, B.S. en Schwab, J.H. (1960) *Biochim. biophys. Acta* 44, 436 - 444.
- Roberts, W.S.L. en Stewart, F.S. (1961) *J. gen. Microbiol.* 24, 253 - 260.
- Roodyn, D.B. en Mandel, H.G. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2036 - 2044.
- Roux, J. (1960) *Ann. Inst. Past.* 99, 286 - 296.
- Ruys, Ch. en van Iterson, W. (1960) *Ant. v. Leeuwenh.* 26, 1 - 8.
- Salton, M.R.J. en Horne, R.W. (1951) *Biochim. biophys. Acta* 7, 177 - 197.
- Salton, M.R.J. (1953) *Biochim. biophys. Acta* 10, 512 - 523.
- Salton, M.R.J. (1954) *J. gen. Microbiol.* 11, IX.
- Salton, M.R.J. en Marshall, B. (1959) *J. gen. Microbiol.* 21, 415 - 420.
- Salton, M.R.J. (1960b) in: „Polysaccharides in Biology”, Transactions 5th conference, ed. G.F. Springer, Josiah Macy Foundation, 71 - 137.
- Salton, M.R.J. en Pavlik, J.G. (1960) *Biochim. biophys. Acta* 39, 398 - 407.
- Scheibel, I. en Assandri, J. (1959) *Acta path. microbiol. scand.* 46, 333 - 338.
- Schnauder, G. (1955) *Z. Hyg. Infektkr.* 141, 404 - 410.
- Schönfeld, J.K. (1959) *Ant. v. Leeuwenh.* 25, 325 - 331.

- Schönfeld, J. K. (1961a) *Ant. v. Leeuwenh.* 27, 261.
 Schönfeld, J. K. (1961b) *Ant. v. Leeuwenh.* 27, 139 - 150.
 Sharp, J. T. (1954) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 87, 94 - 97.
 Sharp, J. T., Hijmans, W. en Dienes, L. (1957) *J. exp. Med.* 105, 153 - 159.
 Shockman, G. D., Kolb, J. J. en Toennies, G. (1957) *Biochim. biophys. Acta* 24, 203 - 204.
 Shockman, G. D. (1959) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 101, 693 - 695.
 Silberstein, J. (1953) *Schweiz. Z. Path. u. Bakt.* 16, 739 - 755.
 Smith, P. F., Peoples, D. M. en Morton, H. E. (1957) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 96, 550 - 553.
 Snell, E. E., Radin, N. S. en Ikawa, M. (1955) *J. Biol. Chem.* 217, 803 - 818.
 Stempen, H. (1955) *J. Bact.* 70, 177 - 181.
 Strange, R. E. (1956) *Biochem. J.* 64, 23P.
 Strange, R. E. en Kent, L. H. (1959) *Biochem. J.* 71, 333 - 339.
 Strominger, J. L. (1957) *J. Biol. Chem.* 224, 509 - 523, 525 - 532.
 Strominger, J. L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1520 - 1524.
 Strominger, J. L., Park, J. T. en Thompson, R. E. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 3263 - 3268.
 Strominger, J. L. en Threnn, R. H. (1959) *Biochim. biophys. Acta* 36, 83 - 92.
 Strominger, J. L., Threnn, R. H. en Scott, S. S. (1959) *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3803 - 3804.
 Strominger, J. L. (1960) in: „Polysaccharides in Biology", Transactions 5th conference, ed. G. F. Springer, Josiah Macy Foundation, 124.
 Tepper, B. S., Hayashi, J. A. en Barkulis, S. S. (1960) *J. Bact.* 79, 33 - 38.
 Toennies, G., Bakay, B. en Shockman, G. D. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 3269 - 3275.
 Tomasz, A. en Borek, E. (1960) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 46, 324 - 327.
 Tulasne, R. (1949) *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 143, 289 - 291.
 Tulasne, R., Minck, R., Kirn, A. en Krembel, J. (1960) *Ann. Inst. Past.* 99, 859 - 874.
 Ward, J. R., Madoff, S. en Dienes, L. (1958) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 97, 132 - 135.
 Weibull, C. (1953) *J. Bact.* 66, 688 - 695.
 Weibull, C. (1958) *Acta path. microbiol. scand.* 42, 324 - 332.
 Weibull, C. (1960) *J. Bact.* 79, 638 - 649.
 Weibull, C. en Beckman, H. (1960) *Nature* 188, 428 - 429.
 Weidel, W., Frank, H. en Martini, H. (1960) *J. gen. Microbiol.* 22, 158 - 166.
 Weinberger, H. J., Madoff, S. en Dienes, L. (1950) *J. Bact.* 59, 765 - 775.
 Welsch, M. (1958) *Schweiz. Z. allg. Path.* 21, 741 - 768.
 Wiley, G. G. en Wilson, A. T. (1961) *J. exp. Med.* 113, 451 - 465.
 Wittler, R. G., Cary, S. G. en Lindberg, R. B. (1956) *J. gen. Microbiol.* 14, 763 - 775.
 Work, E. (1951) *Biochem. J.* 49, 17 - 23.

Gaarne wil ik dank zeggen aan de Geleerde J.H. Ottenheim, Dipl.Chem., Chef van de Afdeling Organische Chemie II van de Staatsmijnente Geleen voor de bereiding van D-lysine en aan de Zeergeleerde F.van Walraven te Voorburg, door wiens bemiddeling de beschikking werd verkregen over D-cycloserine.

Bij de uitvoering van het bacteriologisch gedeelte van de proeven, werd de medewerking van Mejuffrouw M.Kastelein, Mevrouw K.Nikkels-Dijkhuizen en Mejuffrouw A.Dolleman, analysten, op hoge prijs gesteld, terwijl voor het chemisch gedeelte van de proeven de hulp van de heer H.Radema, chemisch technicus, ten zeerste werd gewaardeerd.

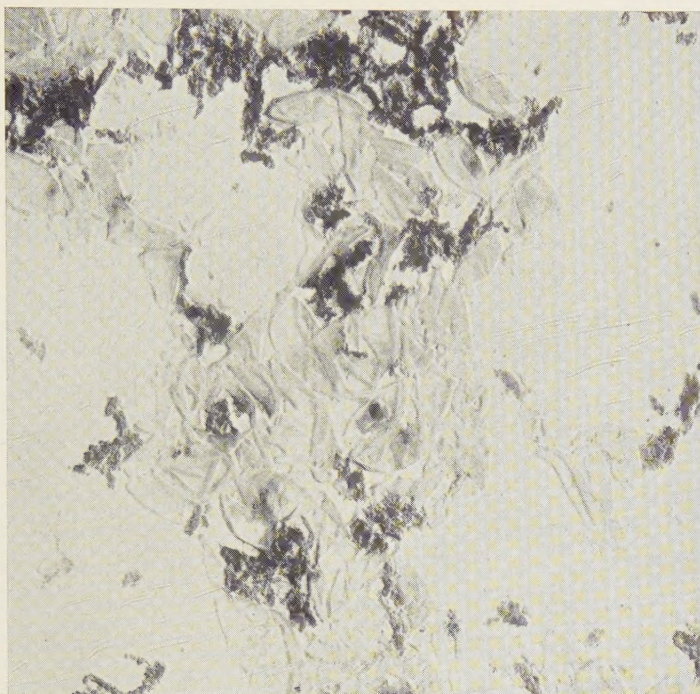


Afb. 1. Onbehandelde cellen.

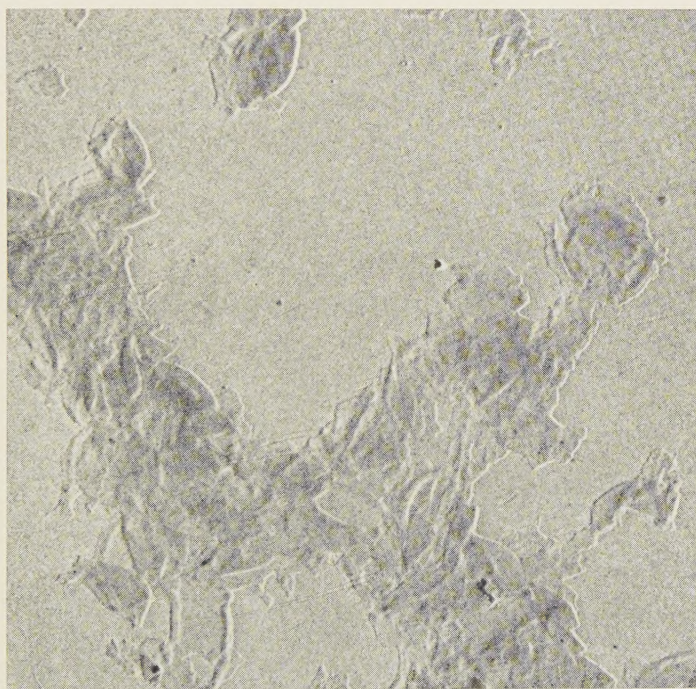


Afb. 2. Celhulzen en cytoplasmaresten bij verbrijzelde cellen,
3 x gewassen in aqua destillata

an celwanden van groep A streptococcen, stam AED.



Afb. 3 Als Afb. 2, doch na 5 wassingen in aqua dest. en 2 wassingen in respectievelijk fysiologisch zout en M/20 fosfaatbuffer.



Afb. 4 Gezuiverde celwanden, verkregen door de verbrijzelde en gewassen cellen te behandelen met ribonuclease en trypsine.

